

ESTUDIO DEL TRÁFICO INTRACELULAR DEL TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO GLT1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

JAIME MARTÍNEZ DE VILLARREAL CHICO

DICIEMBRE DE 2010

MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO
JAIME MARTÍNEZ DE VILLARREAL CHICO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS

DIRECTOR DE LA TESIS:

Dr. FRANCISCO ZAFRA GÓMEZ

CO-DIRECTOR DE LA TESIS:

Dr. CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN

JAIME MARTÍNEZ DE VILLARREAL CHICO

DICIEMBRE 2010

**Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología
Molecular;**

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)

Cuando se cierra una etapa de la vida resulta inevitable mirar hacia atrás y hacer balance. Sin duda terminar mi tesis doctoral es uno de esos momentos y este es el único apartado de ella en el que se me permite salir de lo estrictamente científico...

Pues a ello voy:

Las sensaciones que puedo destacar ahora son las de satisfacción y gratitud.

Satisfacción por haber capeado dignamente el temporal y, creo yo, haber salido bien parado y algo más sabio de cómo ingresé, que por otra parte no es mucho decir...

Gratitud hacia todos aquellos que han intervenido en mayor o menor medida en estos tres años largos de mi vida, muy intensos sin duda.

En primer lugar quiero agradecer de manera especial al Doctor Cecilio Giménez Martín por haberme ayudado, incluso antes de embarcarme en la investigación, a llegar hasta donde me encuentro hoy en día.

Al Doctor Francisco Zafra Gómez por haberme orientado y haber hecho posible la realización de esta tesis.

A las doctoras Beatriz López Corcuera y Carmen Aragón que desde el laboratorio vecino siempre estuvieron dispuestas a ayudarme y aconsejarme con una gran sonrisa.

A mis compañeros de laboratorio:

Enri eres un crack, gracias por haber soportado todas mis preguntas de: ¿donde está esto? ¿queda un poco de aquello? etc,... Todas las broncas que me has echado son pocas para las que merezco...

Inma, por sintonizar conmigo en tantos aspectos y siempre hablarme con la sinceridad de quién no tiene pelos en la lengua ni sombras en el corazón.

Kike siempre ahí codo con codo. De casi todos los atolladeros en los que nos hemos encontrado, hemos salido con un ataque de risa, gracias tío. Eres un amigo.

Noe, pituca, gracias por ser como eres y por representar el contraste, que muchas veces he necesitado, a mi mal humor y mis tonterías.

Aroa, porque tus luces y tus sombras brillan por igual y he disfrutado siendo testigo de ambas.

Gon, eres una de las mejores personas que conozco, nos hemos reído mucho juntos y que lo que el CIBERER ha unido que no lo separe el hombre...

JJ, el hombre tranquilo, si la investigación falla ya sabes que lo del dúo cómico sigue en pie, eres muy grande chaval...

Iciar, haberte cambiado doscientas veces el medio ha compensado, eres un encanto y te deseo mucha suerte en la vida.

Raquel, porque detrás de esa apariencia de timidez se esconde una chica realmente genial, que no se pierdan esas cañas de cuando en cuando...

Espe, ha sido un placer haber compartido contigo este tiempo en el laboratorio y que sepas que tus tupperes merecen un sitio en el MoMA...

Esther, espero que consigas todo lo que buscas y no pierdas nunca esa energía y esa sonrisa permanente que te acompaña.

A todos mis compañeros, cruzarme en el pasillo con vosotros siempre compensó el paseíto. Elisa, María, Leandro, Elise (que nada te cambie locuela...), Argentina, Ana (te debo mi mejor western...), Helena, Lara, Alfonso (aunque seas angolero eres muy grande...), David, Guzmán, etc...

El trío crampón-piolet, Javi, Alber y Deivid, sois unos mostazeros de cuidado pero se os quiere de verdad. Realmente somos Al filo de lo Impresentable...

Al grupo Zambiacongo Capoeira, porque tres veces por semana vuestra energía y vuestras patadas me han espabilado cuando lo necesitaba... ¡Salve galera!

A mis colegas de siempre, Lema, Fede, Guille, Gonzalo, Ale, Diego, Juanjo, sois el entramado sobre el que descansa mi realidad y lo que soy no es ni más ni menos que lo que vosotros opináis de mí.

A toda mi familia. A mi hermana a quien quiero con locura, a mi padre, parecerme a ti me llena de orgullo y sobre todo, a mi madre sin la cual yo no tendría sentido alguno.

Por último, agradecer a la montaña y a todos los parajes que he tenido la suerte de recorrer sólo o acompañado. Porque la naturaleza encierra una magia que, afortunadamente la ciencia jamás llegará a poder explicar...

Índice:

Abreviaturas	1
I. INTRODUCCIÓN	5
I.1. El sistema nervioso, generación y transmisión del impulso nervioso	7
I.2. La sinapsis: diferenciación morfológica y funcional	9
I.3. Neurotransmisión glutamatérgica	10
I.4. Transportadores de glutamato de alta afinidad	12
I.5. Regulación de GLT1	16
I.6. Tráfico intracelular de proteínas de membrana	17
I.6.1. Vía Secretora	17
I.6.2. Endocitosis de proteínas de membrana	20
I.6.2.1. Endocitosis dependiente de clatrina	21
I.6.2.2. Endocitosis independiente de clatrina	22
I.6.3. Endosomas, degradación y reciclaje a membrana plasmática	23
I.7. Ubiquitinación	24
I.8. Regulación de neurotransportadores por ubiquitinación	27
I.9. Desubiquitinación	28
II. OBJETIVOS	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35

III.1. Cultivos celulares	37
III.1.1. Cultivos primarios de astrocitos	37
III.1.2. Cultivos de células C6 y MDCK	38
III.1.3. Transfección de células mediante lipofección	38
III.1.4. Nucleofección de astrocitos	38
III.2. Construcciones plasmídicas	39
III.3. Tratamiento con activadores e inhibidores	39
III.4. Inmunofluorescencia de células cultivadas	40
III.5. Construcción NGFR-GLT1 e inmunofluorescencia	40
III.6. Microscopía óptica y confocal y tratamiento de imágenes	41
III.7. Electroforesis e inmunodetección (inmunotransferencia)	41
III.8. Ensayo de marcaje en superficie celular con el reactivo sulfo-NHS-SS-biotina	42
III.9. Ensayo de inmunoprecipitación	42
III.10. Obtención de un P2 de cerebro de rata	43
III.11. Solubilización e inmunoprecipitación de P2 de cerebro de rata	43
III.12. Análisis e identificación de péptidos tras inmunoprecipitación	44
III.13. Herramientas bioinformáticas	45
 IV. RESULTADOS	 47
IV.1. El transportador de glutamato GLT1 está sujeto a un proceso de endocitosis constitutiva	49
IV.1.1. GLT1 se internaliza tras el tratamiento con el agente ionóforo monensina	49

IV.1.2. NGFR-GLT1 marcado en membrana plasmática se endocita en condiciones basales	51
IV.1.3. El tratamiento con monensina produce una redistribución de GLT1 en la membrana plasmática de astrocitos	53
IV.1.4. NGFR-GLT1 marcado en membrana plasmática de astrocitos se endocita en condiciones basales	55
IV.2. El transportador de glutamato GLT1 endocitado constitutivamente se acumula en compartimentos endosomales tempranos	56
IV.2.1. El transportador GLT1 colocaliza parcialmente con el marcador de endosomas tempranos EEA1 tras el tratamiento con el agente ionóforo monensina	56
IV.2.2. El transportador GLT1 intracelular se localiza a los 15 minutos de tratamiento con monensina en vesículas Rab5 positivas	58
IV.2.3. El transportador GLT1 endocitado constitutivamente queda retenido en endosomas tempranos de reciclaje rápido	61
IV.3. El transportador de glutamato GLT1 se endocita constitutivamente por la vía dependiente de clatrina	63
IV.3.1. El tratamiento con sacarosa hipertónica bloquea el efecto de la monensina y estabiliza a GLT1 en membrana plasmática	63
IV.3.2. El tratamiento con sacarosa hipertónica impide la internalización de NGFR-GLT1 en condiciones basales	65
IV.4. La endocitosis constitutiva de GLT1 es dependiente de ubiquitinación	66
IV.4.1. La inhibición de la enzima E1 produce una retención de NGFR-GLT1 en la membrana plasmática	66
IV.4.2. La inhibición de la enzima E1 produce un incremento de GLT1 en la superficie celular de astrocitos en cultivo primario	68

IV.5. La endocitosis constitutiva de GLT1 es dependiente de ubiquitinación de lisinas intracelulares en su extremo carboxilo _____ 70

IV.5.1. El tratamiento con monensina no produce internalización del mutante GLT1 7KR _____ 71

IV.5.2. NGFR-GLT1 7KR marcado en membrana no se internaliza tras el restablecimiento del tráfico intracelular _____ 72

IV.5.3. NGFR-GLT1 7KR permanece estable en la membrana plasmática de astrocitos más tiempo que el transportador nativo _____ 73

IV.5.4. Los residuos 517 y 526 restablecen la internalización de GLT1 tras el tratamiento con monensina _____ 75

IV.6. El transportador de glutamato GLT1 endocitado constitutivamente está sujeto a un proceso de reciclaje a membrana plasmática _____ 77

IV.6.1. NGFR-GLT1 endocitado constitutivamente vuelve a membrana plasmática a tiempos largos de incubación a 37°C _____ 77

IV.6.2. El tratamiento con leupeptina evidencia que la acumulación de GLT1 intracelular es consecuencia del bloqueo del proceso de reciclaje a membrana plasmática _____ 79

IV.7. El reciclaje de GLT1 endocitado constitutivamente a membrana plasmática es dependiente del proceso de desubiquitinación _____ 81

IV.7.1. La inhibición de la desubiquitinasa UCH L1 en células MDCK promueve el paso de GLT1 a degradación lisosomal _____ 81

IV.7.2. La inhibición de la desubiquitinasa UCH L1 pone de manifiesto la endocitosis constitutiva de GLT1 dependiente de ubiquitinación _____ 83

IV.7.3. El efecto de la desubiquitinasa UCH L1 es específico del tráfico intracelular basal del transportador de glutamato GLT1 _____ 85

IV.7.4. El tratamiento de 30 minutos con el inhibidor de UCH L1 que puso de manifiesto la endocitosis constitutiva de GLT1 nativo corresponde al momento en que el transportador intracelular se halla más ubiquitinado _____ 87

IV.8. El reciclaje del transportador GLT1 a membrana plasmática está regulado por los niveles de calcio intracelular _____ 90

IV.8.1. El tratamiento con el agente quelante de calcio intracelular BAPTA/AM produce una acumulación intracelular de transportador GLT1 _____ 90

IV.8.2. La internalización del transportador puesta de manifiesto por la retirada del calcio intracelular es dependiente de la ubiquitinación de GLT1 siendo el residuo más importante la lisina 526 _____ 91

IV.9. Estudio de las interacciones del transportador GLT1 nativo en membrana plasmática en cerebro _____ 94

V. DISCUSIÓN _____ 97

VI. CONCLUSIONES _____ 111

VII. RESUMEN _____ 115

VIII. BIBLIOGRAFÍA _____ 119

Abreviaturas

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AMPA:** Ácido amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
- **AMSH:** *Associated molecule with the SH3 domain of STAM*
- **AMP cíclico:** Adenosín monofosfato cíclico
- **ARF6:** *ADP-ribosylation factor 6*
- **ARH:** *Autosomal recessive hypercholesterolemia*
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **ATP:** Adenosín trifosfato
- **BAPTA:** Ácido 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacético
- **BSA:** Seroalbúmina bovina
- **COPII:** Coatamer coat protein II
- **CLASPs:** *Co-assembled clathrin-associated proteins*
- **DAB2:** *Disabled2*
- **DAT:** Transportador de dopamina
- **DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbeco
- **EAAC1:** *Excitatory aminoacid carrier 1*
- **EAAT:** *Excitatory aminoacid transporter*
- **ECL:** *Enhanced chemiluminescence*
- **EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético
- **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- **ENaC:** Canal epitelial de sodio
- **EPS15:** *Epidermal growth factor receptor substrate 15*
- **FGFR:** Receptor del factor de crecimiento para fibroblastos
- **FBS:** Suero fetal bovino
- **GABA:** Ácido gamma amino butírico
- **GAT:** Transportador de GABA
- **GFP:** Proteína verde fluorescente
- **GLAST:** Transportador de glutamato aspartato
- **GLT1:** Transportador de glutamato 1

- **GLYT1:** Transportador de glicina 1
- **GLYT2:** Transportador de glicina 2
- **GluR:** Receptor de glutamato
- **GTP:** Guanidin trifosfato
- **GTPasa:** Guanidin trifosfatasa
- **HA:** Hemaglutinina
- **HBSS:** Tampón salino HEPES
- **LTP:** Potenciación a largo plazo
- **MDCK:** Madin Darby canine kidney
- **MEM:** *minimum essential medium*
- **Nedd4-2:** *Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated gene 4*
- **NET:** Transportador de norepinefrina
- **NGFR:** Nerve growth factor receptor
- **NMDA:** N-metil-D-aspartato
- **OTU:** Proteasa de tumor ovárico
- **PAS:** Proteína A sefarosa
- **PBS:** Tampón fosfato salino
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PDZ:** Postsynaptic density 95/Disc large/Zonula occludens-1
- **PFA:** Paraformaldehido
- **PI3K:** Fosfatidil-inositol 3 kinasa
- **PKA:** Proteína kinasa A
- **PKC:** Proteína kinasa C
- **PMA:** Forbol 12-miristato 13-acetato
- **PMSF:** Phenylmethanesulfonylfluorid
- **PSD:** Postsynaptic density
- **RFP:** Proteína roja fluorescente
- **RTK:** Receptor tirosin kinasa
- **SDS:** Dodecil sulfato sódico
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida
- **SERT:** Transportador de serotonina

- **SLC:** *Solute carrier families*
- **SNARE:** Soluble NSF attachment protein receptors
- **SNAT:** *Synaptic neutral aminoacid transporter*
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **SNP:** Sistema nervioso periférico
- **TRIS:** Trihidroximetilaminometano
- **UBPY (USP8):** Ubiquitin specific peptidase 8
- **UCH:** Ubiquitin C-terminal hydrolase
- **YFP:** Proteína amarilla fluorescente

I.INTRODUCCIÓN

I.1. El sistema nervioso, generación y transmisión del impulso nervioso.

El sistema nervioso tiene como principal función recibir y procesar rápidamente señales para así ejercer un control sobre los demás órganos y responder eficazmente a los cambios en el medio ambiente. Anatómicamente, se distinguen el sistema nervioso periférico (SNP) constituido por los nervios craneales y espinales y que corresponde a la zona sensitiva o aferente, encargada de la recepción de una gran diversidad de estímulos externos e internos, y el sistema nervioso central (SNC) que está constituido por el encéfalo y la medula espinal y es el área motora o eferente que genera la respuesta a los estímulos recibidos. Ambos constan de tres elementos celulares principales; la neuroglia, un sistema vascular especializado y las neuronas.

La neuroglia posee múltiples funciones dentro de este sistema y, dependiendo de si se trata de sistema nervioso periférico o central se compone de distintos tipos celulares. Astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias y microglía en el SNC y células de Schwann, células capsulares y células de Müller en el SNP.

Las neuronas son el tipo celular que genera y propaga el impulso nervioso. Pueden presentar distintas morfologías dependiendo de donde se localicen pero todas cuentan con un cuerpo celular o soma, un árbol dendrítico más o menos desarrollado que conecta con otras neuronas y un único axón que envía una respuesta, resultado de la integración de toda la información recibida por la célula. (Figura 1).

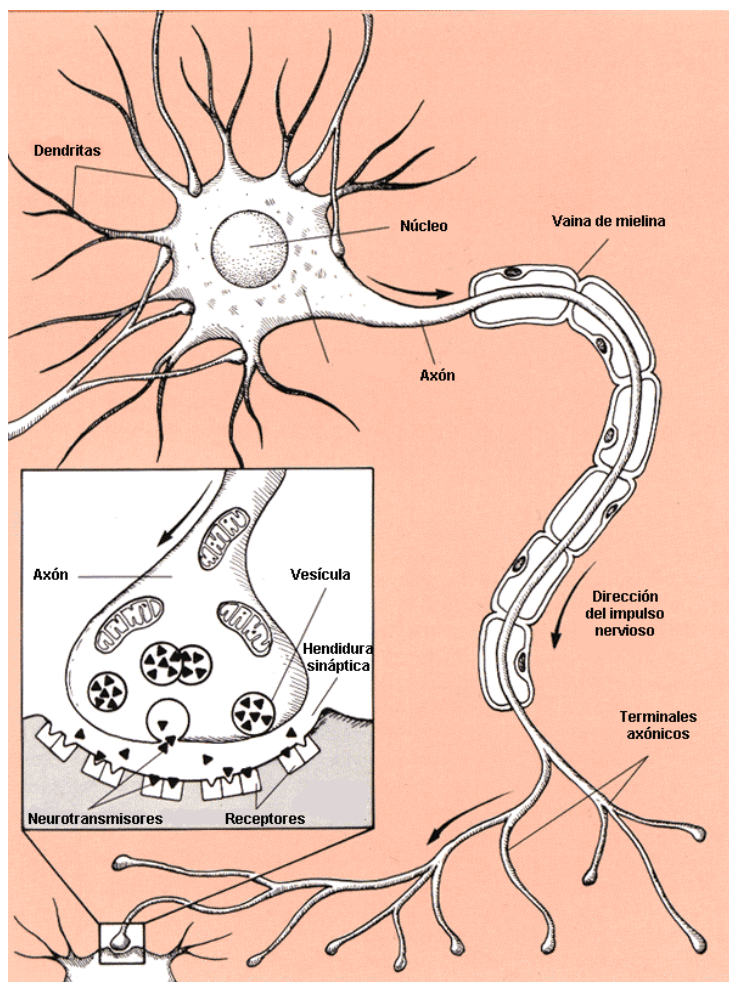


Figura 1: Estructura básica de una neurona.

Transmiten el impulso nervioso gracias a la excitabilidad de su membrana plasmática. En efecto, existe una diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular debido a la distinta concentración de iones generada por el transporte electrogénico llevado a cabo por bombas iónicas como la sodio-potasio ATPasa que mantiene un potencial de membrana en torno a -70 mV. Este potencial de membrana es la base sobre la cual se origina y transmite el impulso nervioso. Cualquier estímulo recibido puede desestabilizar el potencial de membrana basal haciendo que se abran canales de sodio y permitiendo la entrada de este ion, provocando así una

despolarización local, que si alcanza una determinada magnitud (entre 40 y 60 mV) genera un potencial de acción que se transmite a lo largo de la membrana plasmática. Si por el contrario, se produce la apertura de canales de cloro, esto implica una hiperpolarización de la membrana plasmática, es decir una desensibilización de la neurona ya que aleja su potencial del umbral de excitación. La neurona integra toda esta información recibida en el cono axónico y envía su respuesta a través del axón que contacta con otras neuronas o bien con células musculares o glandulares. Es a nivel de la sinapsis donde el impulso nervioso, hasta ahora una onda eléctrica, se transforma en una señal química.

I.2. La sinapsis: diferenciación morfológica y funcional.

La sinapsis es una diferenciación morfológica y funcional que posibilita la comunicación interneuronal. Está constituida por la terminación del axón que se denomina botón presináptico y en aposición directa se encuentra el cuerpo celular o la dendrita de la neurona postsináptica separada por unos 20 a 50 nm. Este espacio se denomina hendidura sináptica y es precisamente aquí donde el impulso nervioso cambia de naturaleza. En efecto, cuando la despolarización llega al final del axón se abren unos canales de calcio dependientes de voltaje y la entrada de este catión produce la fusión de las vesículas portadoras de neurotransmisores con la membrana presináptica en una zona denominada zona densa. Una vez liberados por exocitosis, los neurotransmisores interaccionan con receptores específicos de la membrana postsináptica. Estos receptores pueden ser de dos tipos: ionotrópicos o metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos producen respuestas rápidas abriendo canales iónicos, mientras que los metabotrópicos son aquellos que liberan mensajeros intracelulares como el AMP cíclico, el calcio o los fosfolípidos y actúan por transducción de señal. Existen neurotransmisores de muy distinta naturaleza; desde monoaminas, esteroides, aminoácidos, purinas, prostaglandinas, neuropéptidos a gases como el óxido nítrico o el monóxido de carbono. Pueden tener un efecto excitador o inhibitor en la neurona postsináptica, dependiendo si producen una despolarización o bien una hiperpolarización de su membrana, respectivamente. La glicina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) son dos de los neurotransmisores inhibidores más importantes del SNC, mientras que el glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos y está involucrado en procesos tan importantes como la cognición, la memoria y el aprendizaje (Miyamoto, 2006).

I.3. Neurotransmisión glutamatérgica.

El glutamato es un aminoácido no esencial, ya que se sintetiza en diversos tejidos y cumple muy diversas funciones en el organismo. Es necesario para la síntesis de proteínas, interviene en el metabolismo anabólico del músculo y regula el equilibrio ácido/base en el riñón y la producción de urea en el hígado. Como precursor de la glutamina interviene también en el transporte de nitrógeno entre órganos y en la síntesis de ácidos nucleicos. Su función más relevante en el tema que vamos a tratar es la que posee como neurotransmisor excitador más abundante en el SNC.

Tras su liberación a la hendidura sináptica, el glutamato difunde e interacciona con receptores específicos de la neurona postsináptica. Existen dos grupos de receptores de glutamato, los ionotrópicos y los metabotrópicos acoplados a proteína G. Dentro del grupo de los ionotrópicos se distinguen tres tipos, según sus propiedades farmacológicas y se denominan en función del análogo por el cual se activan: los α - amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), los de kainato y los N-metil-D-aspartato (NMDA). Los receptores de tipo AMPA están formados por cuatro subunidades (GluR1/ 2 / 3 / 4) (Hollmann y Heinemann, 1994) mientras que los receptores de kainato constan de cinco subunidades (GluR5 / 6 / 7 y KA 1 / 2). Los receptores de tipo NMDA presentan una mayor complejidad y constan de las subunidades NR1 y NR2 que forman heterotetrámeros. Estos receptores forman canales catiónicos operados por ligando permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , son bloqueados por concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} y requieren la unión de dos agonistas, el glutamato (subunidad NR2) y la glicina (subunidad NR1) para su correcta apertura (Rambhadrán et al., 2010). Se ha descrito otra subunidad denominada NR3 que recientemente se ha visto que forma heterotetrámeros junto con la subunidad NR1 dando lugar a receptores de tipo NMDA que son capaces de activarse sólo con glicina en ausencia de glutamato (Low y Wee, 2010). La glicina en presencia de glutamato regula el tiempo de apertura del canal así como su desensibilización pero no es capaz por sí misma de inducir apertura (Javitt, 2004). La entrada de Ca^{2+} es responsable de importantes procesos celulares como la potenciación a largo plazo (LTP). Sin embargo, una entrada excesiva de Ca^{2+} por sobrestimulación del receptor es capaz de provocar muerte neuronal por excitotoxicidad, por lo que el glutamato debe ser retirado rápidamente de la hendidura sináptica. De hecho los niveles de glutamato deben mantenerse en el espacio

extracelular en concentración entre 1-5 μM (Rossi et al., 2007). En este proceso intervienen transportadores de alta afinidad localizados en la membrana plasmática de astrocitos y neuronas.

La concentración de glicina en el espacio extracelular oscila entre 6-10 μM , niveles saturantes para el receptor NMDA (Rossi et al., 2007), por lo que una regulación en el microentorno cercano a estos receptores es necesaria. Esta tarea es llevada a cabo por el transportador de glicina de alta afinidad GLYT1, miembro de la familia génica *SLC6*, que interacciona física y funcionalmente con el receptor NMDA a través de la proteína de anclaje PSD95 permitiendo ajustar los niveles de coagonista y así desaturar su sitio de unión en el receptor NMDA (Cubelos et al 2005; Chen et al., 2002).

El glutamato, una vez retirado de la hendidura sináptica por dichos transportadores, se transforma en glutamina en las células de glía adyacentes gracias a la enzima glutamina sintetasa. Esta glutamina vuelve a las neuronas glutamatérgicas (también puede dirigirse a neuronas GABAérgicas) donde se transforma de nuevo en glutamato por deaminación, manteniendo así niveles adecuados de neurotransmisor disponible. Otros transportadores son necesarios para completar este ciclo, tanto gliales capaces de exportar la glutamina al espacio extracelular como neuronales que recapturen esta glutamina. En este punto cabe destacar la importancia de los transportadores de baja afinidad de la familia génica *SLC38*, SN1 (o SNAT3), SN2 (o SNAT5), ATA1 (o SNAT1) y ATA2 (o SNAT2) (Chaudhry, 1999). Este ciclo intercelular entre neuronas y glía se conoce como ciclo glutamato-glutamina (Broer y Brookes, 2001; Patel et al., 2003). El funcionamiento de la sinapsis glutamatérgica y todos sus componentes pueden observarse en la figura 2.

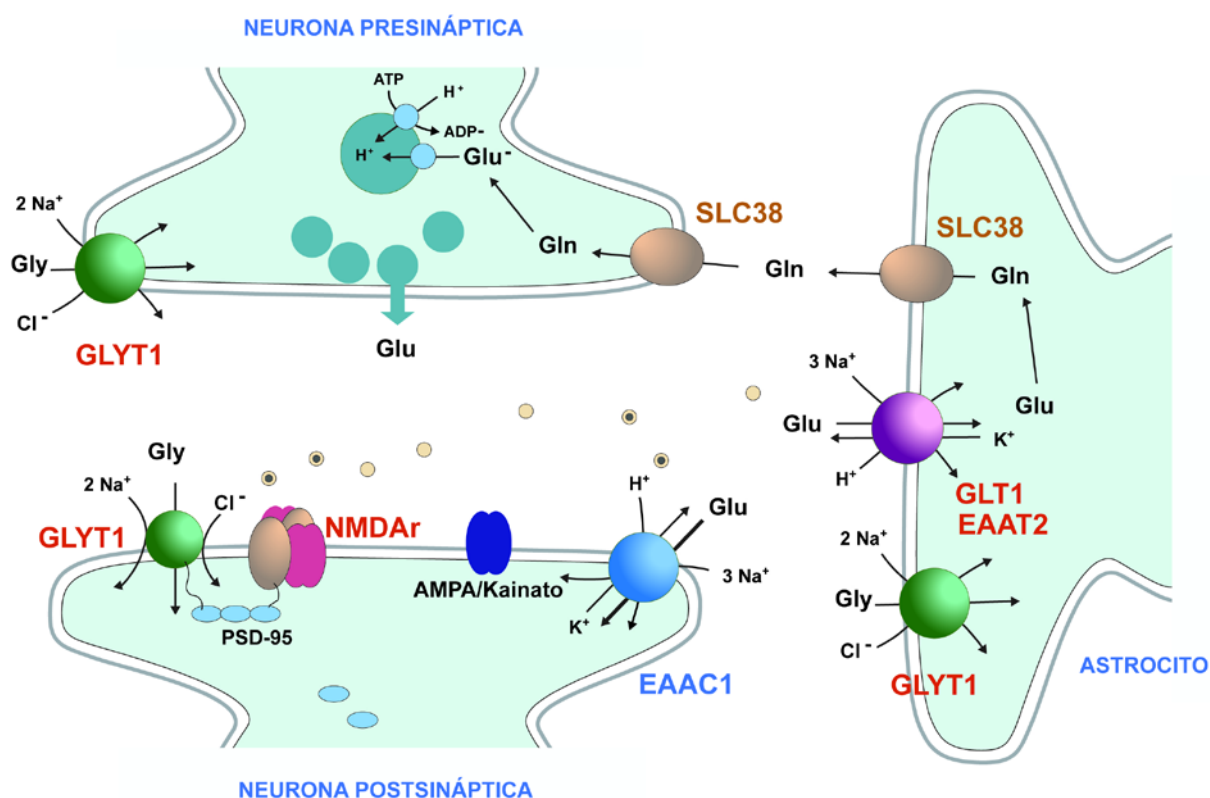


Figura 2: Esquema de una sinapsis glutamatergica. Se representan muchas de las proteínas que intervienen en la neurotransmisión glutamatergica así como en el ciclo glutamato-glutamina.

I.4. Transportadores de glutamato de alta afinidad.

Existen cinco transportadores de alta afinidad para el glutamato, todos dependientes de Na⁺ y K⁺ y miembros de la familia génica *SLC1*: EAAT1 (o GLAST; Storck et al., 1992; Tanaka et al., 1993), EAAT2 (o GLT1; Pines et al., 1992), EAAT3 (o EAAC1; Kanai and Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) y EAAT5 (Arriza et al., 1997). Todos ellos se expresan en cerebro a excepción de EAAT5 que sólo se encuentra en retina (Arriza et al., 1997) (Figura 3).

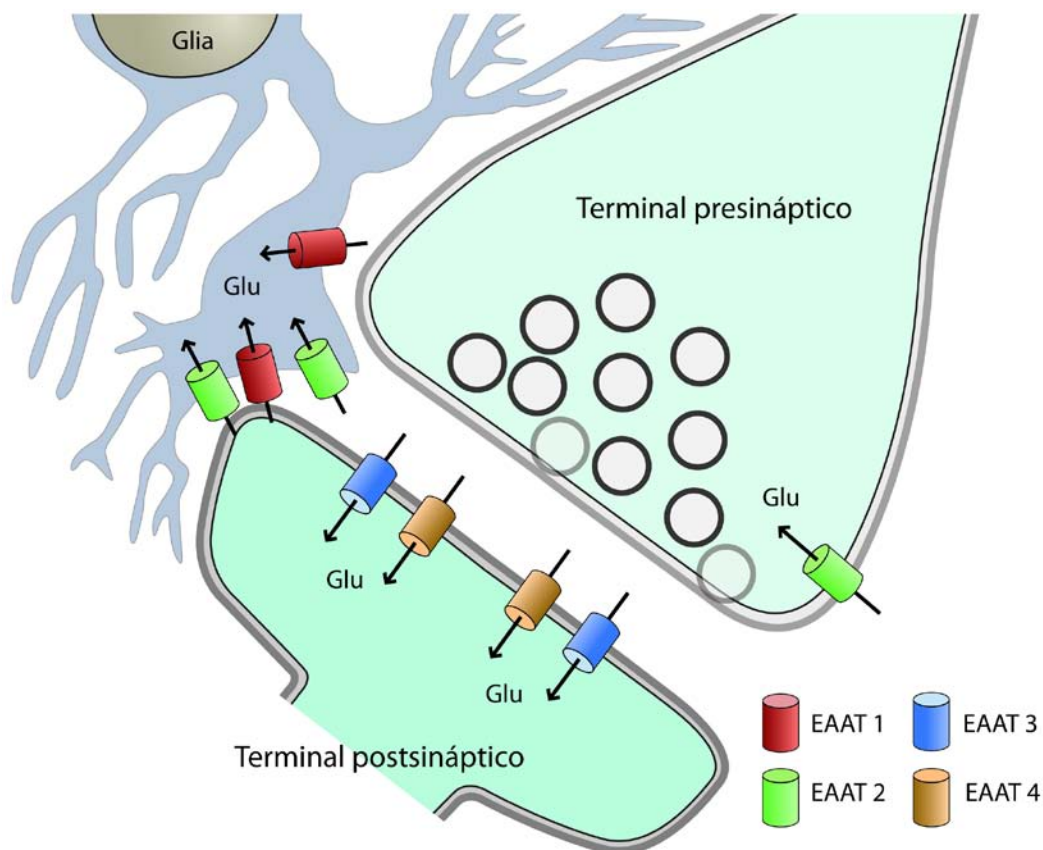


Figura 3: Distribución glial y neuronal de los distintos transportadores de alta afinidad de glutamato (EAATs). Todos ellos se expresan en cerebro excepto EAAT5 que únicamente se localiza en retina.

EAAT1 (GLAST) es el principal transportador de glutamato del cerebelo (Lehre y Danbolt, 1998), el oído interno (Furness y Lehre, 1997 ; Takumi et al., 1997), órganos circumventriculares (Berger y Hediger, 2000) y retina (Derouiche 1995). Se localiza en células astrogliales a lo largo de todo el SNC incluyendo retina y en astrocitos fibrosos de la sustancia blanca (Chaudhry et al., 1995 ; Lehre et al., 1995 ; Schmitt et al., 1997).

EAAT3 (EAAC1) se encuentra en distintos tipos de neuronas, incluyendo neuronas GABAérgicas (Rothstein et al., 1994). Se ha descrito también su presencia en astrocitos de la corteza y la sustancia blanca (Conti et al., 1998). A nivel ultraestructural, su localización es mayoritariamente citoplasmática y perisináptica (Domercq y Matute, 1999 ; Kugler y Schmitt, 1999). En la retina se encuentra en células horizontales, células amacrinas, células ganglionares y en los conos de las células bipolares (Rauen et al., 1999).

EAAT4 se expresa casi exclusivamente en las células de Purkinje de la capa molecular cerebelar (Yamada et al., 1996) aunque también es detectable en otras zonas como el cerebro anterior, el hipocampo o la corteza cerebral (Massie et al., 2008).

Desde un punto de vista cuantitativo, EAAT2 (GLT1) es responsable de hasta un 90 % del transporte de glutamato en el sistema nervioso central (Danbolt, 2001). Se encuentra enriquecido en los astrocitos aunque también se ha descrito su distribución neuronal (Schmitt et al., 2002; Chen et al., 2004 y Holmseth et al., 2009) y es el transportador de glutamato mayoritario en el cerebro anterior.

Existen varias isoformas de GLT1 como resultado de un distinto procesamiento alternativo: GLT1a (Pines et al., 1992), GLT1b (Schmitt et al., 2002) y GLT1c (Rauen et al., 2004). Las dos primeras difieren entre ellas en la secuencia aminoacídica del extremo carboxilo terminal, mientras que la última se diferencia también en la región amino terminal (Figura 4).

GLT1a	MASTEGANNMP	(Pines et al., 1992), rata.	DECKVTLAANKSADCSVEEEPWKREK
GLT1b	MASTEGANNMP	(Schmitt et al., 2002), rata.	DECKVPPFFLDIETCI
GLT1c	Sin determinar	(Rauen et al., 2004), rata.	DECKSLHYVEYQSWV

Figura 4: Distintas variantes de GLT1 por procesamiento alternativo.

En el extremo carboxilo de GLT1b, los últimos cuatro residuos corresponden con una secuencia consenso de unión a dominios PDZ tipo I (-X T/S X Φ-). Los dominios PDZ son dominios de unión proteína-proteína presentes en muchas proteínas de anclaje a membrana y que ejercen importantes funciones en las sinapsis (Kim et al., 2004). Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que GLT1b interacciona con la proteína de anclaje PSD95 y que esta interacción permite mantener al transportador en las proximidades de los receptores postsinápticos de glutamato y así ejercer una regulación más fina de la concentración de neurotransmisor en este microambiente (Gonzalez-Gonzalez et al., 2008).

La distribución subcelular en astrocitos de GLT1a y GLT1b presenta diferencias, puesto que mientras GLT1a se localiza principalmente en regiones distales de los procesos sinápticos, GLT1b parece concentrarse en regiones más proximales (Sullivan et al., 2004).

La estructura tridimensional de GLT1, basada en la del transportador homólogo del procariota *Pyrococcus horikoshii*, consta de ocho segmentos transmembrana (TM1-8) en α -hélice y dos horquillas helicoidales (HPs1-2). Los extremos carboxilo y amino terminal se encuentran ambos orientados hacia el espacio intracelular (Yernool et al., 2004) (Figura 5).

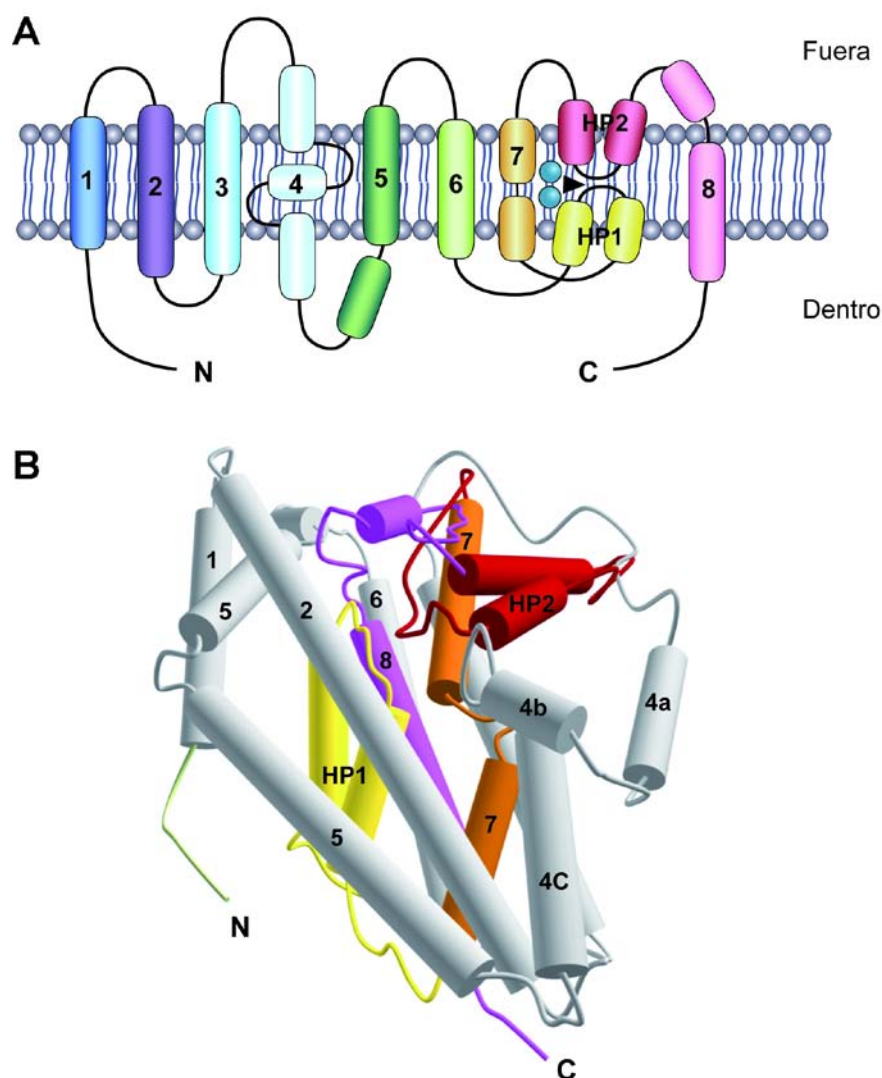


Figura 5: Modelo estructural de GLT1 basado en el homólogo bacteriano *Pyrococcus horikoshii*. (A) Topología de membrana de GLT1 en dos dimensiones. (B) Estructura tridimensional.

I.5. Regulación de GLT1.

La cantidad de neurotransportador presente en la membrana plasmática así como su capacidad intrínseca para retirar el glutamato de la hendidura sináptica condicionan la eficacia con la que se interrumpe la estimulación de la neurona postsináptica y consecuentemente el control de posibles daños celulares por excitotoxicidad. En este sentido, la regulación de la actividad de GLT1 es de gran importancia para la vida y la supervivencia celular.

Se han descrito múltiples agentes reguladores de GLT1 incluyendo segundos mensajeros como el ácido araquidónico (Dunlop et al., 1999) y los radicales libres, y varias kinasas como PI3K (fosfatidil-inositol 3 kinasa), PKA y PKC (Guillet et al., 2005). Por ejemplo, en relación con la activación de la PKC se han descrito diferentes efectos: puede producir un incremento en la actividad de GLT1 si se expresa de manera transitoria en células HeLa transfectadas con el virus vaccinia (Casado et al., 1993) mientras que si lo hace de manera estable, no se ve efecto en la actividad de GLT1 (Tan et al., 1999). En una línea celular que expresa de manera endógena la variante humana de GLT1 (el retinoblastoma Y-79), la activación de PKC produce una disminución en la actividad al aumentar el valor de la K_M para el transporte de glutamato (Crosson CE. et al., 1999). Otros estudios en células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) revelaron una disminución de la actividad para GLT1 transfectado de manera estable (Dunlop et al., 1999). La variabilidad de estos datos sugiere que el efecto que la activación de la PKC ejerce sobre GLT1 podría estar condicionado por el nivel de expresión del transportador así como por la presencia o ausencia de determinadas proteínas que no se expresan por igual en distintas líneas celulares. Sin embargo, estudios más recientes llevados a cabo en cultivos primarios mixtos de neuronas y astrocitos y en células de glioma de rata C6 indican, de manera clara, que la activación de PKC con esteres de forbol promueve la internalización de GLT1 fosforilado (Kalandadze et al., 2002). Esta regulación a la baja parece involucrar al residuo de serina 486 de GLT1 ya que su mutación redujo parcialmente este efecto (Gonzalez et al., 2005). En este punto, datos preliminares de nuestro laboratorio parecen atribuir un papel igualmente importante al residuo de serina 520. Esta endocitosis regulada por PKC es dependiente de la ubiquitinación de lisinas situadas en el extremo carboxilo de GLT1 (Sheldon et al., 2008). Estudios previos de nuestro laboratorio corroboraron esta dependencia de

ubiquitinación y determinaron que son los residuos de lisina 517 y 526 los de mayor importancia (Gonzalez-Gonzalez et al., 2008).

I.6. Tráfico intracelular de proteínas de membrana.

La membrana plasmática de cualquier célula eucariota es un bicapa lipídica en la que de un modo extremadamente dinámico coexisten gran cantidad de proteínas involucradas en procesos muy diversos como la señalización, la captación de nutrientes, la adhesión o el reconocimiento celular. El componente dinámico antes aludido se refiere a que la actividad de cualquier proteína de membrana depende de su permanencia en la misma, por lo tanto, de su tráfico intracelular, ya sea hacia la membrana como proteína sintetizada *de novo* o desde la membrana por endocitosis hacia compartimentos intracelulares para su posterior degradación o reciclaje.

I.6.1. Vía secretora.

Se estima que aproximadamente un tercio de las proteínas traducidas en genomas eucariotas entra en la vía secretora (Dancourt y Barlowe, 2010). Esta vía está compuesta por un complejo sistema de endomembranas y determina la ubicación de cada proteína en la célula y por ende que esta pueda ejercer su función correctamente. Las proteínas recién sintetizadas deben plegarse y procesarse en el retículo endoplásmico para luego terminar su maduración en el aparato de Golgi antes de alcanzar la membrana plasmática (Figura 6).

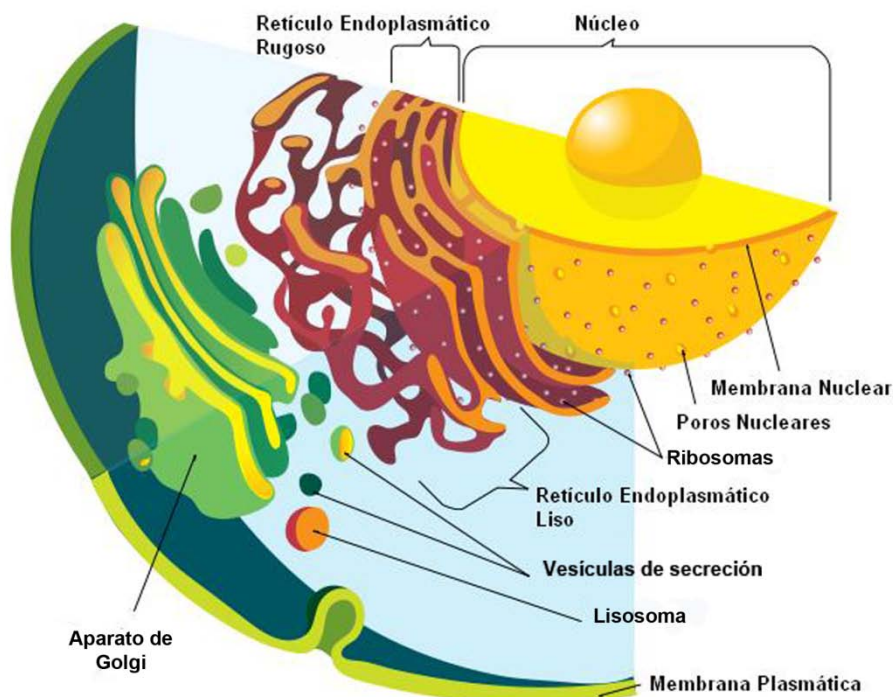


Figura 6: Esquema de las estructuras celulares involucradas en el tráfico intracelular y sistema de endomembranas que componen la vía secretora.

El transporte en vesículas en este sistema de endomembranas es un proceso altamente regulado que debe su selectividad a la cubierta proteica que recubre cada vesícula. En efecto, para cada tipo de cubierta proteica existe una especificidad a nivel del orgánulo del cual la vesícula emerge, de la carga de dicha vesícula o del orgánulo aceptor (Bickford et al., 2004).

La salida de proteínas recién sintetizadas del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi se lleva a cabo en vesículas recubiertas de la proteína COP II (*coat protein II*). La salida del retículo representa un importante punto de control de calidad de las proteínas ya que estas deben estar correctamente plegadas y ensambladas para ser exportadas (Vembar y Brodsky, 2008). La formación de la vesícula recubierta de COP II comienza con la activación de la GTPasa Sar1p por Sec12p. La forma activada Sar1p-GTP inicia la curvatura de la membrana plasmática y recluta el complejo Sec23-Sec24. El complejo Sar1-Sec23/Sec24 interacciona directamente con las proteínas que van a ser exportadas y a través de adaptadores como TANGO también interacciona con moléculas solubles que se incluirán en el interior de las vesículas. El siguiente paso consiste en el reclutamiento del heterodímero Sec13/Sec31 que polimeriza en la

superficie de la membrana terminando de formar la cubierta proteica de COPII. Finalmente, tras la hidrólisis de la molécula de GTP unida a Sar1 la vesícula se libera y la cubierta de COPII se desensambla en sus componentes individuales (Figura 7) (Budnik et al., 2009; Russell et al, 2010).

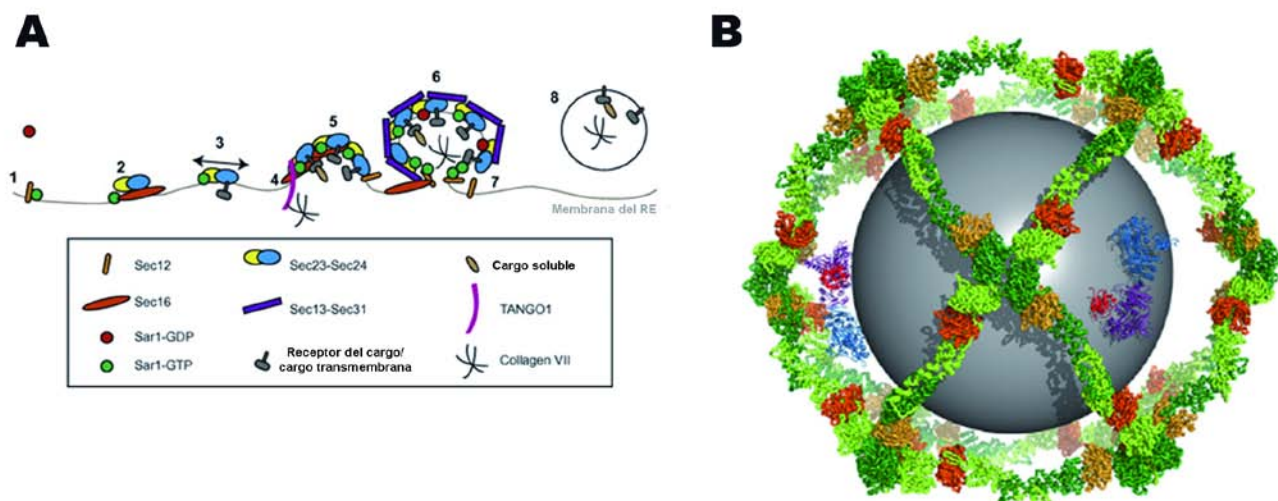


Figura 7: **A.** Formación de una vesícula recubierta de COPII. En el recuadro se indican todas las proteínas que intervienen en este proceso. **B.** Estructura tridimensional de dicha vesícula en la que se representan las distintas proteínas que componen la cubierta.

Este transporte llevado a cabo en vesículas tipo COPII se conoce como transporte anterogrado en contraposición al transporte retrogrado llevado a cabo en dirección opuesta en vesículas recubiertas por COPI y que garantiza el reciclaje de componentes vesiculares y el rescate de proteínas del retículo endoplásmico (Lee et al., 2004).

Una vez en el aparato de Golgi, las proteínas recorren la red *cis-trans* de este orgánulo y terminan su maduración por glicosilación. El tipo de glicosilación depende de si la proteína va a ser secretada, va a integrarse a la membrana plasmática o va a desempeñar sus funciones en otros orgánulos como por ejemplo las proteínas lisosomales.

La salida del aparato de Golgi y la llegada de estas proteínas a membrana plasmática está regulada por un complejo proteico octamérico (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84) denominado exocisto que controla la fusión de las vesículas secretoras a la membrana (Figura 8). Estas vesículas son las portadoras de las

proteínas que van a ser secretadas al exterior celular, localizadas en el lumen, y de las proteínas de membrana plasmática integradas en la propia membrana vesicular. La actividad del exocisto está regulada por GTPasas como Cdc-42, Rho1 y Rho3 (He y Guo, 2009).

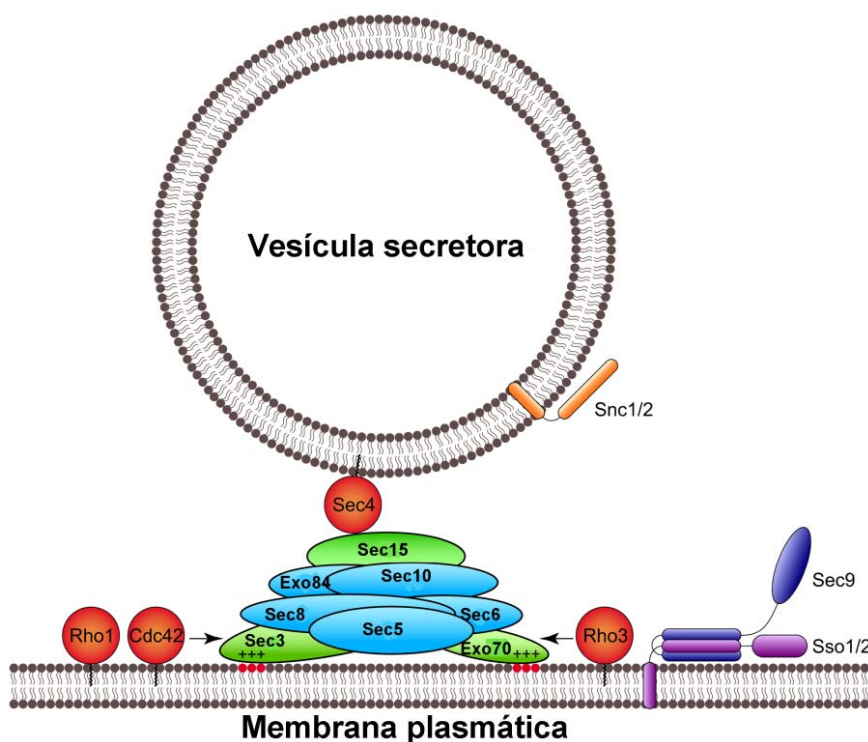


Figura 8: Llegada e inclusión de una vesícula secretora a membrana plasmática. Se representan el complejo proteico octamérico exocisto (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84) así como otras proteínas necesarias en este proceso.

I.6.2. Endocitosis de proteínas de membrana.

La endocitosis es el proceso celular básico mediante el cual la célula internaliza una gran diversidad de sustancias. Existen distintos tipos de endocitosis que varían según el cargo que vaya a internalizarse. En cualquier caso, cada vía de endocitosis requiere un mecanismo previo de selección en la membrana plasmática.

En primer lugar, se distinguen la fagocitosis y la macropinocitosis por ser vías que suponen la internalización de porciones relativamente grandes de membrana plasmática (mayor de 1µm). La fagocitosis es un mecanismo de endocitosis basado en el citoesqueleto de actina que emplea la célula para internalizar partículas de gran tamaño como por ejemplo bacterias. La macropinocitosis por su parte, interviene en la

captación de fluidos extracelulares y factores de crecimiento y también es dependiente del citoesqueleto de actina (Mayor y Pagano, 2007).

Por otro lado, existen diversas vías de endocitosis en las que la porción de membrana plasmática involucrada es mucho menor. En este punto, la diversidad de alternativas es muy elevada y en cada caso están involucradas distintas proteínas y adaptadores. Podemos distinguir la vía de endocitosis dependiente de clatrina, muy estudiada, y vías de endocitosis independientes de clatrina pudiendo ser éstas dependientes de caveolina y dinamina, sólo de dinamina, o no depender de ninguna de estas proteínas. Todas estas posibilidades se esquematizan en la figura 9 y se detallan a continuación.

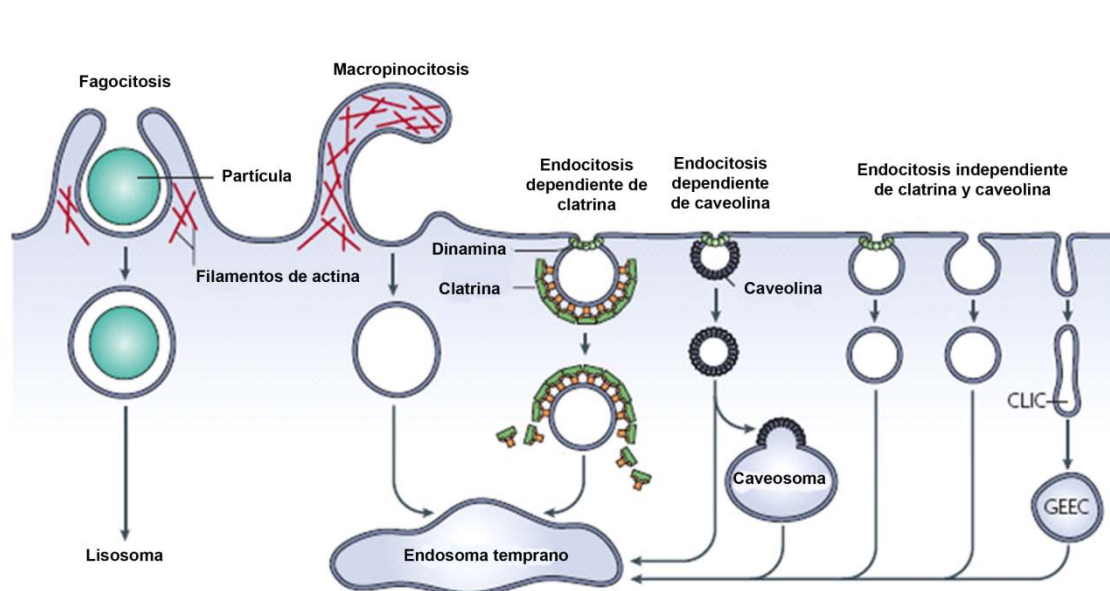


Figura 9: Esquema de las distintas vías de endocitosis en una célula eucariota.

I.6.2.1. Endocitosis dependiente de clatrina.

La vía de endocitosis dependiente de clatrina constituye la vía mayoritaria a través de la cual las proteínas son internalizadas en células eucariotas. Estas proteínas se endocitan hacia los endosomas tempranos desde donde pueden pasar a otros compartimentos intracelulares, a degradación lisosomal o bien, por un proceso de reciclaje, volver a la membrana plasmática (Ungewickell et al., 2007). Esta vía ha sido ampliamente estudiada e involucra a gran cantidad de proteínas accesorias y adaptadores.

La clatrina es un protómero en forma de trisquelion compuesto por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras que polimeriza de forma poliédrica y forma la cubierta proteica de las vesículas celulares que se escinden de la membrana plasmática (Young, 2007).

La dinamina, por su parte, es una GTPasa de 100 kDa encargada de la fisión de las vesículas que emergen de la membrana plasmática y de otras membranas celulares. Esta proteína oligomeriza formando unos anillos que rodean y constriñen la base de la invaginación de la membrana. Su propia oligomerización estimula la actividad GTPasa necesaria para la escisión final de la vesícula (Praefcke et al., 2004).

Los adaptadores son aquellos componentes necesarios para el reconocimiento y el reclutamiento de las proteínas que van a ser endocitadas. Dentro de los adaptadores pueden distinguirse por un lado el adaptador tetramérico AP-2 y por otro, el grupo denominado CLASPs (*co-assembled clathrin-associated sorting proteins*) entre los que se encuentran ARH, DAB2, β -arrestina 1 y 2 o EPS15 (Traub et al., 2009). El reconocimiento se lleva a cabo gracias a la presencia de señales específicas en el cargo que va ser endocitado. Estas señales pueden ser determinadas secuencias aminoácidas o bien modificaciones postraduccionales. Así pues, el adaptador AP-2, a través de sus distintas subunidades reconoce motivos basados en tirosinas (YXX ϕ) y motivos dileucinas ([DE]XXXL[LI]), mientras que los otros adaptadores monoméricos reconocen señales tipo FXNPXY y la ubiquitinación de las proteínas diana (Ungewickell et al., 2007).

La formación de la vesícula recubierta de clatrina se produce simultáneamente al reconocimiento por parte de estos adaptadores de la proteína diana, evitándose así el ensamblaje y la endocitosis de vesículas vacías (Ehrlich et al., 2004). La fuerza necesaria para producir la invaginación se realiza a través del citoesqueleto de actina.

I.6.2.2. Endocitosis independiente de clatrina.

Dentro de las vías de endocitosis independientes de clatrina la mejor caracterizada es la vía dependiente de caveolina. Esta vía está íntimamente relacionada con las balsas lipídicas, microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (Simons et al., 1997), los cuales intervienen en el posicionamiento y la función de muchas proteínas de membrana, entre ellas receptores y transportadores de

neurotransmisores (Allen et al., 2007). La caveolina es la proteína que recubre las vesículas endocitadas, llamadas caveolas, de 50 a 80 nm que convergen en el caveosoma. Esta vía de endocitosis es también dependiente de dinamina.

Una segunda vía independiente de clatrina pero dependiente de dinamina, es aquella que involucra a la GTPasa RhoA, cuya función parece ser la de reclutar componentes del citoesqueleto de actina necesarios para la endocitosis (Lamaze et al., 2001).

Por último, existen vías de endocitosis donde no intervienen ni la clatrina ni la dinamina y que se caracterizan por la implicación de pequeñas GTPasas como CDC42 o ARF6 (Guha et al., 2003; D'Souza-Schorey et al., 2006).

I.6.3. Endosomas, degradación y reciclaje a membrana plasmática.

Una vez endocitadas, independientemente de la vía involucrada, las proteínas de membrana se dirigen a los endosomas. El sistema endosomal es una red túbulo-vesicular muy dinámica que se extiende por todo el citoplasma de la célula y que regula la degradación o el reciclaje de las proteínas internalizadas, además de representar un importante sitio de transducción de señales (Murphy et al., 2009).

En efecto, se ha observado que proteínas internalizadas desde la membrana plasmática pueden seguir ejerciendo su función desde los endosomas. Este es el caso de algunos receptores acoplados a proteína G, que mediante su interacción con las arrestinas, pueden ejercer una señalización independiente de proteína G (DeWire et al., 2007).

Por otra parte, los endosomas están estrechamente relacionados con el proceso de ubiquitinación / desubiquitinación ya que muchas proteínas marcadas por ubiquitina se internalizan pasando a este sistema endosomal y su destino depende de cómo éste marcaje progresa. Así pues, existen dos desubiquitininasas endosomales, AMSH y UBPY cuya actividad determina el reciclaje o paso a degradación lisosomal de proteínas de membrana como EGFR, promoviendo su reciclaje a membrana plasmática (AMSH) o bien regulando su paso a lisosomas y posterior degradación (UBPY) (McCullough et al., 2004; Row et al., 2006).

El sistema endosomal está compuesto por distintos compartimentos intracelulares. En primer lugar se encuentran los endosomas tempranos, compartimentos cercanos a la membrana plasmática y lugar donde convergen las proteínas internalizadas. Desde estos endosomas tempranos puede producirse un reciclaje a membrana, denominado reciclaje rápido (*'short loop' recycling*), o bien continuar hacia otros compartimentos intracelulares. El reciclaje desde compartimentos posteriores se denomina reciclaje tardío (*'long loop' recycling*). Por último, las proteínas que no se reciclan a membrana pasan a los endosomas tardíos, compartimentos desde donde se dirigen a degradación lisosomal. El paso de un compartimento a otro está estrechamente regulado por una familia de pequeñas GTPasas denominadas Rab GTPasas. En humano existen más de 60 Rab GTPasas situadas en distintos compartimentos intracelulares (Schwartz et al., 2007). Estas proteínas garantizan un correcto destino del cargo endocitado controlando la identidad de cada compartimento, la fusión vesicular así como su movilidad y el desensamblaje de las cubiertas proteicas, a través del reclutamiento de adaptadores, kinasas, fosfatasa y componentes del citoesqueleto (Stenmark, 2009).

I.7. Ubiquitinación.

La ubiquitinación es una modificación postraducciona de un número muy importante de proteínas que implica la unión covalente del polipéptido altamente conservado de 76 aminoácidos ubiquitina o de una cadena de poliubiquitina, que se lleva a cabo por la acción secuencial de tres enzimas. La enzima E1 activa la molécula de ubiquitina mediante una reacción dependiente de ATP que forma un enlace tioéster entre la cisteína presente en su sitio activo y el extremo C- terminal de la molécula de ubiquitina. La ubiquitina activada se transfiere a la cisteína del sitio activo de la enzima E2. En la última reacción, catalizada por E2 con ayuda de E3 o directamente por E3, se forma un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de la molécula de ubiquitina y el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana (Figura 10).

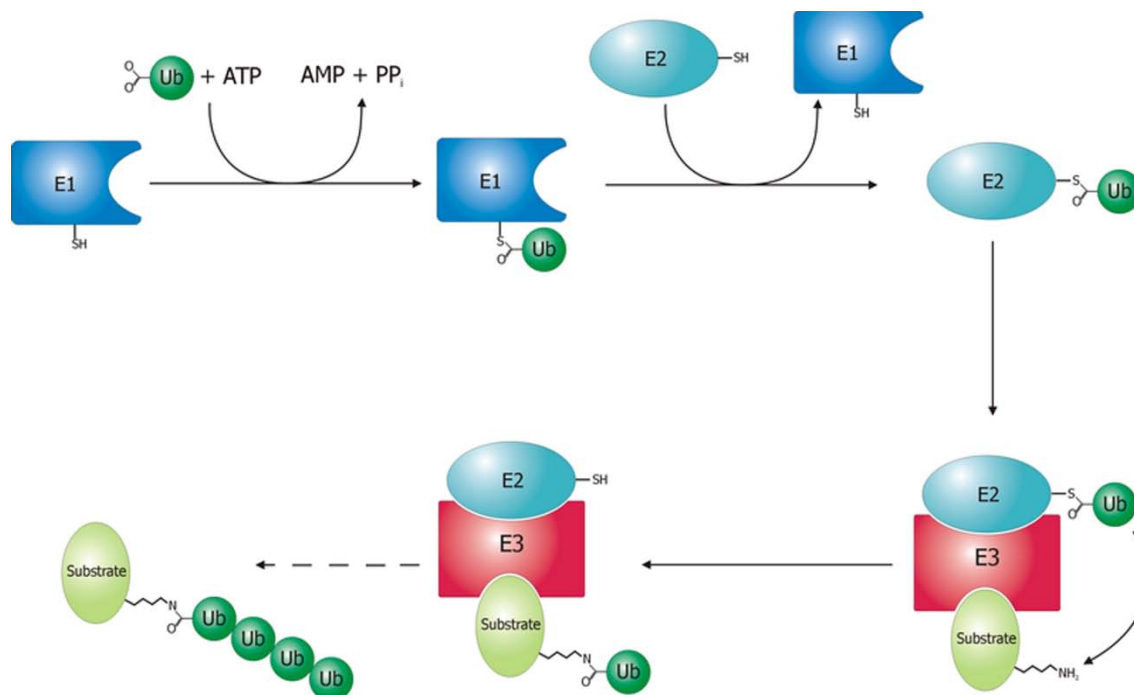


Figura 10: Esquema de las tres etapas de la reacción de ubiquitinación. Esta modificación postraduccional de las proteínas se lleva a cabo por la acción secuencial de tres enzimas (E1, E2 y E3).

Existe tan sólo una o quizás dos enzimas del tipo E1, unas sesenta enzimas E2 y más de 400 enzimas E3 (ubiquitin ligasas) codificadas en el genoma humano (Li et al., 2005). Esta abundancia de ubiquitin ligasas permite a estas proteínas poseer una elevada especificidad de sustrato en este sistema de marcaje por ubiquitinación (Ma, 2007).

La unión de una sola molécula de ubiquitina a una lisina de la proteína diana se define como monoubiquitinación, y si esta misma unión se realiza en varios residuos de lisina, entonces se trata de multiubiquitinación. La ubiquitina posee siete residuos de lisina a través de los cuales puede formar cadenas de varias unidades (Lys⁶, Lys¹¹, Lys²⁷, Lys²⁹, Lys³³, Lys⁴⁸ y Lys⁶³) formando un enlace isopeptídico con el residuo de glicina Gly⁷⁶ del extremo C- terminal de otra molécula de ubiquitina. La unión de una cadena de varias moléculas de ubiquitina se denomina poliubiquitinación. A pesar de que estos siete residuos de lisina son capaces de conjugar moléculas de ubiquitina para formar una cadena, las cadenas unidas a través de Lys⁴⁸ y Lys⁶³ son las más abundantes (Peng et al., 2003; Meierhofer et al., 2008). La mayoría de los estudios publicados sugieren que las cadenas de poliubiquitina unidas a través de Lys⁴⁸ son una señal de reconocimiento para el proteasoma (26S) y dirigen a las proteínas marcadas a su

degradación. Sin embargo, las cadenas de poliubiquitina unidas a través de Lys⁶³ regulan procesos como la endocitosis y el tráfico de proteínas de membrana, la respuesta inflamatoria, la función ribosomal y la reparación del ADN (Pickart et al., 2004) (Figura 11).

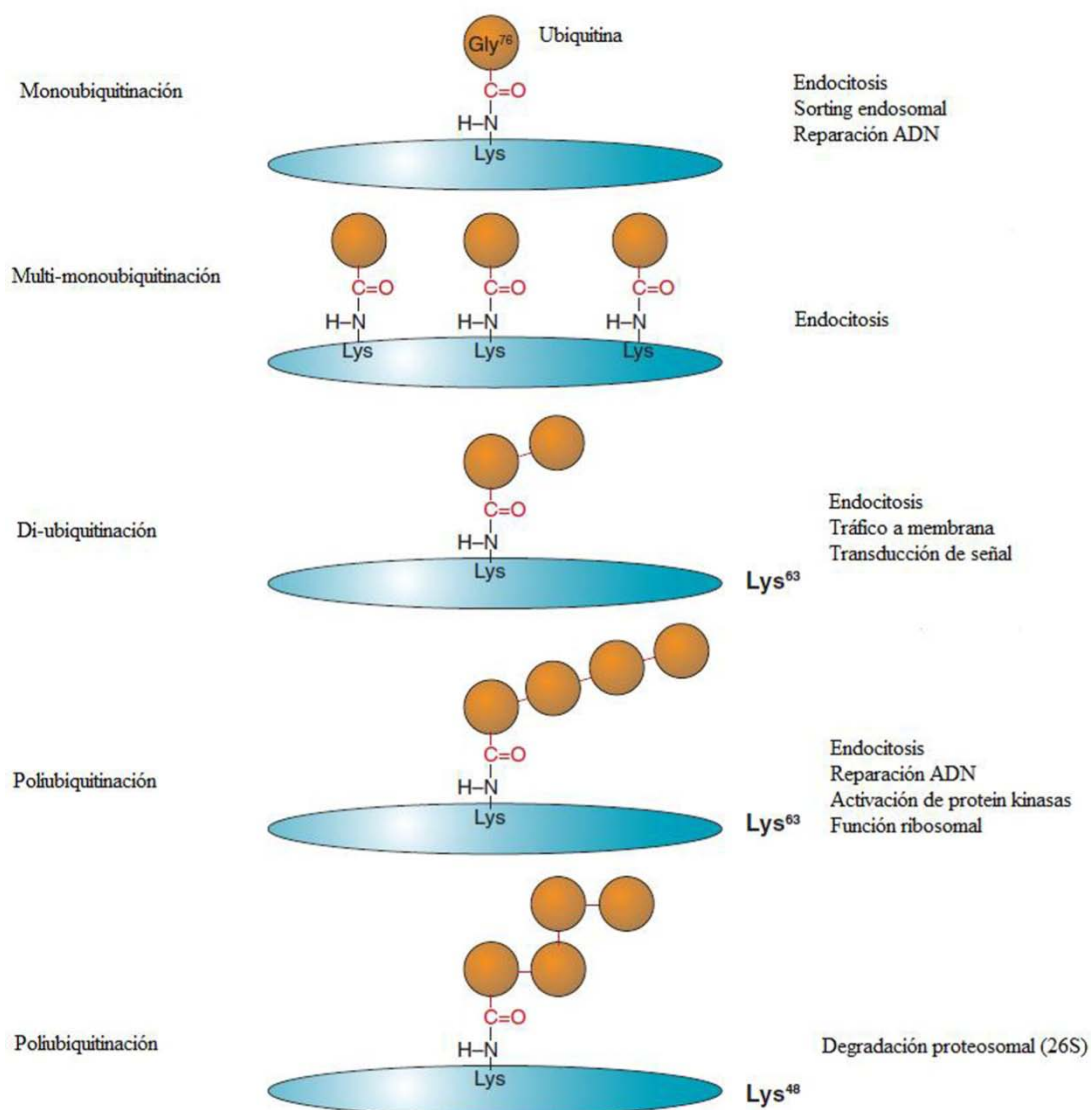


Figura 11: Esquema de los distintos tipos de ubiquitinación y procesos celulares que regulan.

Las primeras evidencias de que el proceso de ubiquitinación regula la endocitosis y el tráfico intracelular de proteínas de membrana fueron halladas en estudios llevados a cabo en levaduras, donde se observó que la ubiquitina es necesaria en las primeras etapas de internalización así como en determinar el destino de las proteínas internalizadas (Kolling y Hollenberg, 1994; Hicke y Riezman, 1996).

En células de mamífero la situación es mucho más compleja ya que no sólo se ubiquitina la proteína diana sino que además puede requerirse la ubiquitinación de proteínas asociadas y de componentes de la maquinaria endocítica (ubiquitinación indirecta).

Existen numerosos ejemplos de proteínas de membrana cuyo tráfico está regulado por ubiquitinación y quizás uno de los mejores estudiados sea la familia de los receptores tirosin kinasas (RTKs). En efecto, la regulación a la baja de la mayoría de los RTKs parece involucrar a esta modificación postraducciona aunque el papel exacto de la ubiquitina en la etapa inicial de la endocitosis del receptor no está en todos los casos plenamente esclarecido. Este es el caso del receptor del factor de crecimiento para fibroblastos (FGFR) (Haugsten et al., 2008) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), donde se ha observado que la mutación de los sitios de ubiquitinación no afecta a su internalización, por lo que seguramente se deba a la existencia de vías alternativas de endocitosis reguladas por otro tipo de señales (Huang et al., 2007). Análisis cuantitativos por espectrometría de masas demostraron que EGFR se encuentra monoubiquitinado y poliubiquitinado por cadenas unidas a través de Lys⁶³, lo que indica que la unión de una sola molécula de ubiquitina puede ser suficiente para la internalización del receptor aunque las cadenas de poliubiquitina son, seguramente, señales de internalización más eficaces (Huang et al., 2006). Otra hipótesis podría ser que monoubiquitina y poliubiquitina sean señales que intervengan en distintas etapas del proceso endocítico. La ubiquitinación no sólo regula la endocitosis de estos receptores sino que también determina su destino una vez internalizados ya que de este marcaje depende que sean degradados en los lisosomas o puedan reciclarse de nuevo a membrana (Row et al., 2006).

I.8. Regulación de neurotransportadores por ubiquitinación.

El tráfico intracelular de los neurotransportadores está sometido a regulación por ubiquitinación. Como hemos mencionado anteriormente, la internalización de GLT1 tras activación de la PKC es dependiente de la ubiquitinación de las lisinas de su extremo carboxilo terminal. En efecto, la mutación de los siete residuos de lisina a arginina produjo una proteína que no se internalizó tras activación de la PKC por esteroides de forbol. Las lisinas 517 y 526 parecen ser las más importantes ya que su

reintroducción restablecía la internalización observada para GLT1 nativo (Sheldon et al., 2008; Gonzalez-Gonzalez et al., 2008).

Esto ocurre del mismo modo en el transportador de dopamina (DAT) donde la internalización tras tratamiento con esteroides de forbol requiere la ubiquitinación de tres lisinas situadas en el extremo N-terminal del transportador (Lys¹⁹, Lys²⁷ y Lys³⁵) (Miranda et al., 2007). Sin embargo, estudios recientes sugieren que la endocitosis constitutiva de DAT, es decir sin ningún tipo de activación o estímulo, no es dependiente de ubiquitinación, al menos totalmente (Eriksen et al., 2010).

En el caso del transportador de glicina GLYT1, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que tanto su endocitosis regulada por PKC como su endocitosis constitutiva dependen de la ubiquitinación de residuos de lisina de su extremo carboxilo terminal, en particular de la lisina 619 (Fernández-Sánchez et al., 2009).

A la luz de todos estos resultados, podemos observar que la ubiquitinación representa un importante agente regulador del tráfico intracelular de neurotransportadores, aunque en cada caso parece intervenir de manera específica. De cualquier manera, esto no excluye la existencia de vías de regulación alternativas.

I.9. Desubiquitinación.

La ubiquitinación es una modificación reversible de las proteínas. En efecto, existe una superfamilia de isopeptidasas denominadas desubiquitininasas o enzimas desubiquitinantes que son capaces de retirar la ubiquitina de las proteínas marcadas, realizando así una función opuesta a la de las ubiquitin ligasas.

Existen alrededor de 80 desubiquitininasas codificadas en el genoma humano agrupadas en cinco grandes familias: las ubiquitin proteasas C- terminal (UCHs), las ubiquitin proteasas específicas (USPs), las proteasas de tumor ovárico (OTUs), la familia Josephins y la familia JAMM/MPN+ (Nijman et al., 2005). Las cuatro primeras familias pertenecen al grupo de las cistein-proteasas, mientras que la quinta está compuesta de zinc-metaloproteasas (Komander et al., 2009). Poseen otras dos funciones importantes, la de generar ubiquitina libre cortando las cadenas recién sintetizadas de

poliubiquitina y la de modificar el tipo de marcaje por ubiquitinación, alterando la estructura de las cadenas.

La mayoría de las desubiquitinasas catalizan una reacción proteolítica entre el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina y un grupo carboxilo del extremo C- terminal de la molécula de ubiquitina. Aunque el número de desubiquitinasas no es muy elevado, estas enzimas pueden presentar especificidad a varios niveles. En primer lugar, estudios bioquímicos recientes revelan que residuos del extremo C- terminal de la molécula de ubiquitina (Arg⁷⁴ y Gly⁷⁵) son cruciales para el reconocimiento por parte de las desubiquitinasas (Drag et al., 2008). Existe especificidad en el tipo de unión en las cadenas de poliubiquitina, y se han descrito desubiquitinasas específicas de poliubiquitina unida a través de Lys⁴⁸ y otras de Lys⁶³, aunque la mayoría de las analizadas son promiscuas (Hu et al., 2005; Komander et al., 2008 y Komander et al., 2009). Otro mecanismo mediante el cual las desubiquitinasas pueden adquirir un alto grado de especificidad concierne al posicionamiento de éstas con respecto a la cadena de poliubiquitina. Se ha observado que desubiquitinasas asociadas al marcaje ligado al proceso de degradación proteosomal (USP 14) tienen una actividad exoproteasa, es decir que catalizan la reacción proteolítica de la última molécula de ubiquitina de la cadena, mientras que otras desubiquitinasas que regulan la señalización a través de ubiquitina presentan una actividad endoproteasa (CYLD, USP9X, AMSH-LP y A20) (Hu et al., 2005; Komander et al., 2008; Lin et al., 2008; Sato et al., 2008 y Al-Hakim et al., 2008).

Las desubiquitinasas presentan una gran diversidad de funciones fisiológicas puesto que intervienen en todos los procesos celulares regulados por ubiquitinación. En primer lugar, las desubiquitinasas regulan el nivel de ubiquitina libre en la célula disponible para el marcaje de proteínas. Pueden aumentar la estabilidad de determinadas proteínas evitando que estas pasen a degradación, ya sea proteosomal o lisosomal. Esto puede convertir a las desubiquitinasas en interesantes dianas terapéuticas si regulan, por ejemplo, la estabilidad del producto de un protooncogen (Hoeller et al., 2009). Ejercen también su función sobre proteínas de membrana interviniendo en su tráfico intracelular. Este es el caso del receptor EGFR cuyo reciclaje a membrana está regulado por AMSH en los endosomas tempranos ya que su desubiquitinación evita que dicho receptor pase a degradación lisosomal (McCullough et al., 2004 y Huang et al., 2006).

Las desubiquitinasas también intervienen en el tráfico y endocitosis de canales iónicos como en el caso del canal epitelial de sodio (ENaC) y su regulación por parte de la desubiquitinasas Usp2-45 y UCH L3 (Ruffieux-Daidié et al., 2008; Butterworth et al., 2007). Por otra parte, además de ejercer una función opuesta a las ubiquitin ligasas actuando directamente sobre las proteínas ubiquitinadas, se ha demostrado que pueden ejercer un control más fino en el sistema de ubiquitinación ya que son capaces de regular la propia actividad de las ubiquitin ligasas (Lu et al., 2009 y Cao et al., 2007) e incluso de componentes de la maquinaria endocítica (Mizuno et al., 2006 y Boulkroun et al., 2008).

II. OBJETIVOS

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de mamíferos e interviene en procesos tan relevantes como la cognición, la memoria y el aprendizaje. Su liberación a la hendidura sináptica permite la continuación del impulso nervioso por estimulación de receptores específicos localizados en la membrana plasmática de la neurona postsináptica. El neurotransmisor ha de ser retirado de la hendidura sináptica para evitar posibles daños neuronales por excitotoxicidad. En este punto, intervienen cinco transportadores de glutamato de alta afinidad dependientes de Na^+ y K^+ y miembros de la familia génica *SLC1*: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 y EAAT5. GLT1 se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática de astrocitos y es responsable de un 90% del transporte de glutamato en el sistema nervioso central. Su actividad, por lo tanto, depende de su presencia en la membrana plasmática. Se han descrito numerosos agentes reguladores de GLT1 como segundos mensajeros y varias kinasas. La PKC regula la endocitosis de GLT1, ya que su activación promueve la internalización del transportador ubiquitinado. En el caso de otros neurotransportadores, como el de dopamina (DAT) y el de glicina (GLYT1), se ha descrito la existencia de un tráfico intracelular basal en el que no intervienen agentes reguladores como los antes citados. Este tráfico basal determina la cantidad de neurotransportador presente en la membrana plasmática y consecuentemente regula su actividad de captación y retirada de los neurotransmisores.

Debido a la importancia de la función del transportador GLT1 en la terminación de la neurotransmisión glutamatérgica y en evitar daños neuronales por sobreexcitación, es crucial comprender los mecanismos que regulan su tráfico intracelular basal y, por lo tanto, su presencia en la membrana plasmática. De esta manera, los objetivos de esta tesis son:

1. La puesta de manifiesto y caracterización de un proceso de endocitosis constitutiva del transportador de glutamato GLT1.
2. El estudio del papel de la ubiquitinación del transportador GLT1 en este proceso de endocitosis constitutiva.
3. La puesta en evidencia y caracterización de un proceso de reciclaje a membrana plasmática del transportador GLT1 internalizado constitutivamente.
4. Determinar las proteínas que intervienen en este tráfico basal del transportador GLT1.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. Cultivos celulares

III. 1.1. Cultivos primarios de astrocitos.

Se utilizaron ratas Wistar de 2 o 3 días de edad. Se extrajo el cerebro y se aislaron las cortezas cerebrales desechando el hipocampo y retirando bien las meninges. La disección se realizó en HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se homogeneizó el tejido mediante 5 pulsos con pipeta Pasteur de vidrio y posteriormente se incubó 10 minutos en un baño a 37°C . Se centrifugó la muestra 3 minutos a 800 rpm. Retiramos el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de DMEM /HAM F12 / 15% FBS. Se volvió a homogeneizar el tejido, esta vez con 25 pulsos a través de una pipeta Pasteur estrechada a la llama, para después volver a centrifugar 3 minutos a 800 rpm. Se resuspendió el sobrenadante en el volumen adecuado de DMEM /HAM F12 / 15% FBS y plaqueamos. Transcurridas 24 horas se cambió el medio por DMEM /HAM F12 / 10% FBS en el cual se crecieron posteriormente.

III.1.2. Cultivos de células C6 y MDCK.

La línea celular C6 proviene de glioma de rata. La línea celular MDCK (Madin-Darby canine kidney) proviene de epitelio renal de perro y se caracteriza por crecer en monocapa por lo que son ideales para estudiar proteínas de membrana. Estas células se crecieron a 37°C y 5% CO₂ en medio MEM de Eagle (*Minimum Essential Medium*) para MDCK y DMEM de Eagle (*Dulbecco' Modified Eagle Medium*) para C6, suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS).

III.1.3. Transfección de células mediante lipofección.

Las transfecciones transitorias en MDCK se llevaron a cabo utilizando el sistema comercial de lipofección Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para células C6 se utilizó el sistema de lipofección Neofectina (Mid Atlantic Biolabs). Las células se cultivaron a una confluencia aproximada del 75% para la transfección y se incubaron durante 4-6 horas con una mezcla de DNA y lipofectamina / neofectina a 37°C y 5% CO₂ en MEM / DMEM sin suero. Transcurrido ese tiempo, el medio se cambió por MEM / DMEM con 10% FBS. El ensayo con estas células se llevó a cabo 48 horas después de ser transfectadas.

III.1.4. Nucleofección de astrocitos.

Los cultivos primarios de astrocitos fueron nucleofectados usando el *Amaxa Rat Astrocyte Nucleofector Kit* (Lonza) y el nucleofector II (Amaxa Biosystems). En primer lugar se tripsinizaron los astrocitos con el fin de conseguir una suspensión celular. Una vez obtenida, se procedió al conteo de células en cámara de Neubauer para tomar 2×10^6 , número óptimo de células para la nucleofección. Tras centrifugar 10 minutos a 80

×g, resuspendimos el pellet en 100µl de solución de nucleofección previamente suplementada y añadimos 2-5 µg de ADN. Se pasó esta suspensión a una cubeta de nucleofección y se nucleofectó utilizando el programa T-020 del nucleofector. Inmediatamente, se añadió 500 µl de medio celular para evitar toxicidad y se plaquearon las células. Se procedió al ensayo con estos astrocitos transcurridas 72 horas desde la nucleofección.

III. 2. Construcciones plasmídicas.

Los mutantes de GLT1 utilizados en este estudio se prepararon usando un molde de GLT1 de rata (*Rattus norvegicus*) en pCDNA3 mediante el método de mutagénesis dirigida por técnicas de PCR y por el método de *QuickChange site-directed mutagenesis kit* (de acuerdo a las instrucciones del fabricante). Previamente, epítomos de YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) y HA fueron introducidos en el extremo N-terminal del transportador mediante PCR. La inclusión de estos epítomos no tiene efecto en la actividad ni distribución subcelular del transportador. Las mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciación.

III. 3. Tratamiento con activadores e inhibidores.

Las células transfectadas así como los astrocitos nucleofectados se incubaron durante los tiempos adecuados y correspondientes para cada tratamiento disueltos en el medio celular a las concentraciones que a continuación se detallan: monensina 35µM (Calbiochem), filipina 5µg/ml (Sigma), metil-beta-ciclodextrina 10 mM (Sigma), sacarosa 350 mM (Sigma), leupeptina 100 µg/ml (Sigma), inhibidores de UCHL1(LDN) y UCHL3 10µM (Calbiochem), inhibidor de la enzima E1 PYR41 50 µM (Calbiochem) y BAPTA/AM 30 µM (Calbiochem). En las muestras no tratadas se utilizó el vehículo correspondiente como control. Todos los reactivos se prepararon en el momento de su uso a partir de soluciones concentradas 1000 veces.

III. 4. Inmunofluorescencia de células cultivadas.

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos. Transcurridas 48 horas desde su transfección las células se lavaron con PBS y se fijaron con 4% PFA en PBS durante 15 minutos. Tras un segundo lavado en PBS, las células se bloquearon con 10% de FBS y 0.02% de digitonina en PBS durante 30 minutos para permeabilizarlas. A continuación, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C en PBS con 0.1% de FBS. Tras 3 lavados en PBS, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (Alexa 488, Alexa 555, Alexa 594 o Alexa 647), dejando la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras otros tres lavados en PBS, se montaron las preparaciones para su observación en el microscopio empleando como medio de montaje Vectashield (Vector, Burlingame, CA, U.S.A).

III. 5. Construcción NGFR-GLT1 e inmunfluorescencia.

Sobre el mismo molde con el que se realizaron las construcciones antes citadas y mediante el mismo método, se introdujo el fragmento codificante del receptor de baja afinidad de NGF (*Nerve Growth Factor*), de tal manera que la proteína quimera resultante presenta dicho receptor acoplado al extremo amino terminal de GLT1 y expuesto al espacio extracelular.

Empleando esta construcción se realizó el marcaje *in vivo* en membrana plasmática en frío. En primer lugar, para detener el tráfico intracelular se incubaron a 4°C las células 10 minutos antes de realizar el marcaje tras lo cual se lavaron las células transfectadas 3 veces con PBS frío. La incubación con el anticuerpo primario anti receptor de NGF se realizó durante 30 minutos a 4°C. Tras otros tres lavados con PBS frío se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo durante 30

minutos en frío y en oscuridad. Una vez realizado el marcaje las células se devolvieron al incubador a 37°C y, tras los correspondientes tratamientos, fueron fijadas con 4% PFA en PBS durante 15 minutos y se realizó el montaje para su observación en el microscopio.

III. 6. Microscopia óptica y confocal y tratamiento de imágenes.

Todas la inmunofluorescencias fueron visualizadas en un microscopio de barrido láser confocal acoplado a un microscopio, vertical Axio Imagen.Z1 M o invertido Axiovert200 M (Zeiss) a un aumento de 63X. Las imágenes fueron tomadas y procesadas gracias a los programas Zeiss LSM510 4.2 y LSM Image Browser.

III. 7. Electroforesis e inmunodetección (inmunotransferencia).

Las muestras fueron separadas según su masa molecular por electroforesis realizada en minigeles (Sistema de electroforesis MiniProtean3, BioRad) de poliacrilamida (7% acrilamida y 0,2% bisacrilamida) y SDS al 10% en condiciones reductoras. Las muestras se sometieron a una corriente constante de 25 mA durante 3 horas en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, glicina 192 mM, SDS 0,1%). Tras la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, mediante un sistema de electrotransferencia semiseca (Life-Technologies) a 1,2 mA/cm² durante 35 minutos en un tampón de transferencia que contiene metanol al 15%, Tris a 48 mM, Glicina a 40 mM y SDS. La unión inespecífica de proteínas fue bloqueada incubando las membranas con leche en polvo desnatada al 5% en PBS durante 30 minutos, RT. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios adecuados diluidos en la solución de bloqueo. Tras lavar las membranas, se incubaron en oscuridad con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa y diluido 1:5000 en solución de bloqueo. Las bandas se visualizaron con el método de detección ECL (Amersham Bioscience).

III. 8. Ensayo de marcaje de superficie celular con el reactivo sulfo-NHS-SS-biotina.

Las células transfectadas transcurridas 48 y los astrocitos nucleofectados transcurridas 72 horas se lavaron con PBS frío y se incubaron 20 minutos a 4°C con 1 ml de una disolución de Sulfo-NHS-SS-Biotina (Thermo Scientific) en PBS con calcio (1mg/ml). Las células se lavaron con PBS dos veces y se dejaron a 4°C una hora con una disolución de lisina 100 mM en PBS para neutralizar la acción de la biotina. Después de tres lavados con PBS, las células se lisaron en 1 ml de medio de lisis (50 mM Tris- HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 % NP 40, 0.1 % SDS, 0.5 % deoxicolato y 2 mM EDTA) durante media hora. Después de centrifugar las células 15 minutos a 14000 rpm, se tomaron 15 µl del lisado para cargarlo en un gel de SDS poliacrilamida, y las proteínas biotiniladas se recuperaron incubando, durante 90 minutos a temperatura ambiente, el resto del sobrenadante con 50 µl de bolas de estreptavidina agarosa (Sigma). Después de cinco lavados con medio de lisis, las bolas de estreptavidina agarosa se resuspendieron en medio de carga Laemmli 1,5 X y se cargaron en un gel de SDS poliacrilamida. Tras la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, las proteínas se detectaron con un anticuerpo contra el epítipo HA colocado en el extremo amino de GLT1.

III. 9. Ensayo de inmunoprecipitación

Transcurridas 48 horas tras la transfección se lavaron las células con PBS frío tras lo cual se lisaron en 1 ml de medio de lisis (50 mM Tris- HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 % NP 40, 0.1 % SDS, 0.5 % deoxicolato y 2 mM EDTA) durante media hora. Después de centrifugar 15 minutos a 14000 rpm, el lisado celular se incubó toda la noche con el anticuerpo primario frente al epítipo HA. Se añadió un volumen de 40µl de proteína A sefarosa PAS (Sigma) y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. La proteína A fue aislada de *Staphylococcus aureus* y tiene una gran afinidad

por el fragmento Fc de las inmunoglobulinas. Transcurrido este tiempo se lavaron las bolas de PAS con medio de lisis cinco veces durante 10 minutos se resuspendieron en medio de carga laemmli 1,5 X. Tras 3 minutos a 92°C para disociar la unión con las bolas de PAS se cargaron en un gel de SDS poliacrilamida.

III. 10. Obtención de un P2 de cerebro de rata.

Se sacrificaron ratas Wistar de tres meses por el método de dislocación cervical. Tras la extracción y disección del cerebro del animal, el tejido se homogeneizó en un buffer salino (NaCl 0.3 M, Tris-HCl pH 7.5 20 mM y EDTA 5 mM) a 4°C al que se añadió PMSF 0.4 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). Las muestras se centrifugaron a 900 x g durante 10 min, se obtuvo un sobrenadante (S1) y un pellet (P1) que se descartó. El sobrenadante S1 se centrifugó a 20 000 x g durante 30 min obteniéndose así un segundo pellet (P2) enriquecido en membranas celulares.

III. 11. Solubilización e inmunoprecipitación de P2 de cerebro de rata.

El P2 obtenido se solubilizó durante 1 hora a 4°C en buffer de solubilización (NaCl 0.3 M, Tris-HCl pH 7.5 20 mM, 10 % Dimetil-Maltosido y EDTA 5 mM). Tras la centrifugación, el precipitado insoluble fue desechado y los sobrenadantes fueron incubados con los anticuepos correspondientes durante toda la noche a 4°C. Se añadieron 40 µl de PAS y se procedió a la inmunoprecipitación como se ha descrito anteriormente.

III. 12. Análisis e identificación de péptidos tras inmunoprecipitación.

Las muestras de la inmunoprecipitación del P2 de cerebro de rata fueron separadas en un minigel (Sistema de electroforesis MiniProtean3, BioRad) de poliacrilamida en gradiente (4-10%). El gel se fijó en metanol-acético (40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua), fue teñido con SYPRO Ruby y las bandas de interés se recortaron de forma manual minimizando la cantidad de gel y se digirieron “in situ” manualmente con tripsina empleando un protocolo basado en el descrito por Shevchenko et al (1996) con algunas modificaciones. El sobrenadante obtenido de la digestión se acidificó con ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% concentración final y se secó en el *speed-vac*. Posteriormente se resuspendieron en 10 µl de TFA 0,1% y se desalaron las muestra mediante zip-tip. Los eluidos finales se secaron en *speed-vac*, se resuspendieron en 0,1% fórmico en agua (Solvente A) grado LC-MS y se analizaron mediante RP-LC-MS en un sistema Agilent HPLC acoplado a un espectrómetro de masas tipo electrospray con un analizador trampa iónica (ESI-IT) modelo LTQ Velos (Thermo-Fisher, Scientific), empleando una columna de 180 µm de diámetro interno a un flujo de 1,8 µl/min, en modo micro-spray con una interfase “*metal needle-kit*” (Thermo-Fisher Scientific). Los péptidos se eluyeron utilizando un gradiente de 5 a 40% de solvente B (Solvente A: 0,1 % ácido fórmico en agua, solvente B 0,1 % ácido fórmico, 80% acetonitrilo en agua). Los péptidos fueron detectados en modo Full scan de 400 a 1600 amu (1 µscan) seguido por 10 MS/MS dependiente de scan utilizando como ventana de aislamiento 3 amu y energía de colisión normalizada 35%.

La identificación de los péptidos se realizó mediante el programa “Proteome Discoverer 1.2” de Thermo Fisher Scientific, utilizando como base de datos “uniprot-mammalia”. Los criterios utilizados para la búsqueda fueron: enzima tripsina después de Arg y Lys, 2 sitios de corte, tolerancia del precursor 1,0 Da, tolerancia de los fragmentos de iones 0,8 Da, como modificaciones variables oxidación de metionina y carboamidometilación en cisteínas.

III.13. Herramientas bioinformáticas.

*CLUSTALW: Programa que contiene una base de datos que permite comparar múltiples secuencias de ADN o de proteína y muestra el mejor alineamiento posible entre ellas. Además, indica los residuos conservados, el grado de conservación de los mismos y permite la construcción de árboles filogenéticos.

Acceso en la dirección: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>

*MEDLINE Entrez: Es una base de datos de publicaciones que pertenece a la *National Library of Medicine* (NLM). Dispone de información bibliográfica de biomedicina.

Acceso en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi>

*BLAST (Basic Local Alignment Tools): Programa que encuentra en las bases de datos secuencias de proteínas y ADN. Permite identificar una secuencia dada con las secuencias de la base de datos y muestra una lista de los alineamientos más satisfactorios.

Acceso desde la dirección: <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.

IV. RESULTADOS

IV.1. El transportador de glutamato GLT1 está sujeto a un proceso de endocitosis constitutiva.

Como ya se ha descrito en el apartado de Introducción, GLT1, al igual que otros muchos neurotransportadores está sometido a regulación por parte de diversos agentes como segundos mensajeros y varias kinasas. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la PKC regula la endocitosis del transportador ya que su activación por esteres de forbol (PMA) produce la internalización de GLT1 desde la membrana plasmática al interior celular (González-González et al., 2008). En el presente trabajo se pretende poner de manifiesto la existencia de un proceso de endocitosis constitutiva del neurotransportador, es decir, que no requiera de la activación previa de ningún agente regulador como los que se han mencionado. Este proceso de endocitosis constitutiva formaría parte de lo que podríamos denominar tráfico intracelular basal de GLT1. La existencia de un tráfico basal ha sido previamente descrito para otros neurotransportadores como el de dopamina (DAT) o de glicina (GLYT1) (Eriksen et al., 2010; Fernández-Sánchez et al., 2009). Para evidenciarlo en el caso de GLT1, se utilizaron los siguientes abordajes:

IV.1.1. GLT1 se internaliza tras el tratamiento con el agente ionóforo monensina.

La monensina es un agente ionóforo que disipa el gradiente de protones en vesículas intracelulares por lo que interfiere en la formación de vesículas emergentes de los endosomas tempranos. Como consecuencia se paraliza el tráfico intracelular de las proteínas endocitadas constitutivamente desde la membrana plasmática ya que no

pueden ni volver a membrana por un proceso de reciclaje ni pasar a degradación lisosomal. Este compuesto, por lo tanto, no activa ningún agente regulador sino que simplemente evidencia la existencia de un tráfico intracelular basal alterando la creación y movilidad de las vesículas de transporte (Figura 12A).

Células MDCK transfectadas con el transportador GLT1 unido al epítipo HA fueron tratadas con monensina a una concentración de 35 μ M durante 30 minutos a 37°C. Este tratamiento produjo una acumulación de GLT1 intracelular que no se observó en la situación control donde el transportador se situaba distribuido homogéneamente por toda la membrana plasmática (Figura 12B).

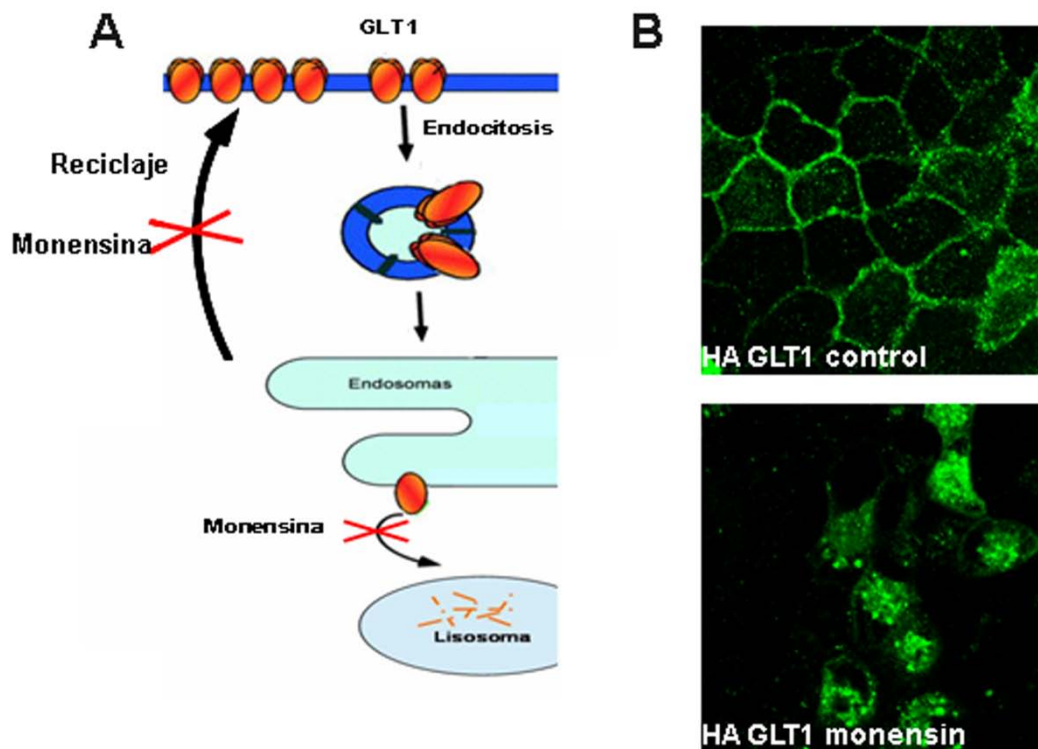


Figura 12. Efecto del agente ionóforo monensina sobre el transportador GLT1 en células MDCK.

A: Esquema del fundamento del tratamiento con monensina. La monensina es un agente ionóforo que disipa el gradiente de protones necesario para la formación de vesículas emergentes de los endosomas tempranos y por lo tanto, paraliza el tráfico intracelular de proteínas endocitadas por el bloqueo, tanto de su reciclaje como de su degradación lisosomal. **B:** Células MDCK se cultivaron en cubreobjetos y fueron transfectadas con HA-GLT1. Transcurridas 48 horas fueron tratadas con monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C), se procedió a su marcaje gracias a un anticuerpo primario anti-HA y un secundario acoplado al fluoróforo Alexa 488. Se visualizaron en microscopio de fluorescencia. Nótese como el tratamiento con monensina produjo una acumulación intracelular de HA-GLT1

La acumulación intracelular observada corresponde, por la tanto, a GLT1 endocitado de manera constitutiva y que, debido al bloqueo producido por la monensina, no puede seguir progresando en su transporte intracelular ya sea por reciclaje a membrana plasmática o por transferencia a compartimentos endosomales posteriores para ser degradado en los lisosomas.

Sin embargo, mediante este abordaje experimental no se podía descartar completamente que el transportador GLT1 localizado en el interior celular no lo fuese como consecuencia de la acumulación de proteína sintetizada *de novo* y paralizada en su tránsito hacia la membrana. Por ello, se decidió estudiar este fenómeno empleando una herramienta que permitiese marcar únicamente el transportador ya presente en membrana plasmática.

IV.1.2. NGFR-GLT1 marcado en membrana plasmática se endocita en condiciones basales.

Para poder marcar de manera inequívoca el transportador GLT1 residente en la membrana en el momento de iniciar los estudios de endocitosis se requería la presencia de un epítipo accesible sólo desde la cara externa de la membrana plasmática. En nuestros estudios iniciales esto se pudo conseguir añadiendo en el extremo amino terminal del transportador intracelular una proteína que introducía un dominio transmembrana extra, el receptor NGF p75 (*Nerve Growth Factor*), obteniéndose la proteína quimérica NGFR-GLT1 (Figura 13A). Estudios previos demostraron que la quimera era funcional en lo que a transporte de glutamato se refiere, lo que indica un plegamiento correcto del transportador. La fracción de NGFR-GLT1 localizada en la membrana plasmática se podía marcar con anticuerpos contra el dominio extracelular de NGFR. Este marcaje *in vivo* se realizaba a 4°C, temperatura a la cual se encontraba paralizado el tráfico intracelular.

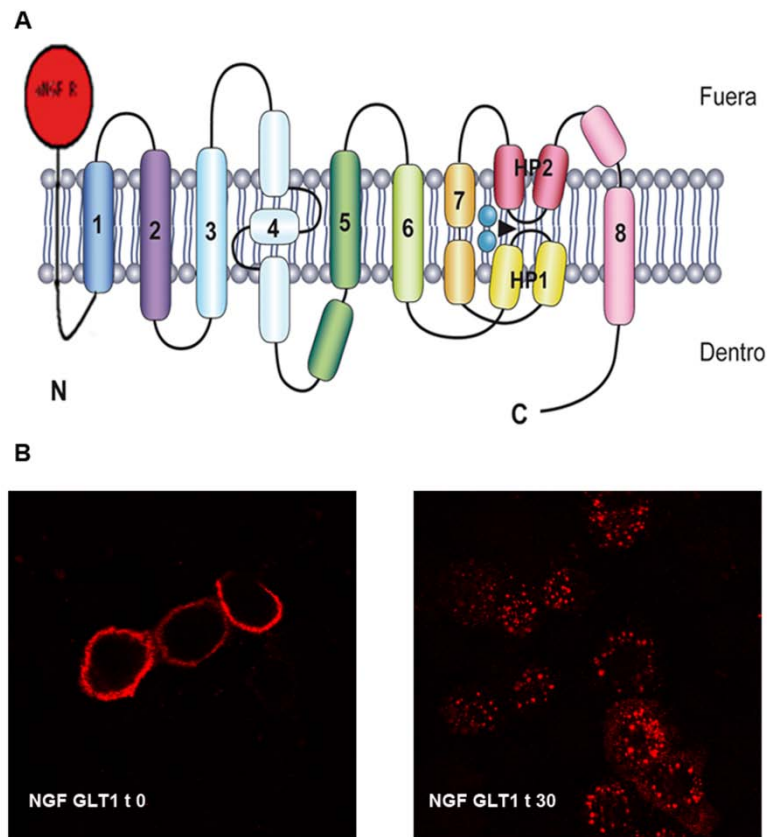


Figura 13. Marcaje *in vivo* en membrana plasmática de la proteína quimera NGFR-GLT1 en células MDCK.

A: Esquema de la proteína quimerica NGFR-GLT1. Esta construcción presentaba el receptor de NGF p75 acoplado a la región amino terminal del transportador GLT1. El dominio Nt de NGFR quedaba orientado hacia el exterior celular de tal forma que se pudo realizar su marcaje en membrana plasmática. **B:** Células MDCK fueron transfectadas con la quimera NGFR-GLT1. Transcurridas 48 horas, se realizó el marcaje *in vivo* a 4°C, temperatura a la cual se encontraba paralizado el tráfico intracelular, con el anticuerpo anti NGFR y un secundario acoplado al fluoróforo Alexa 555. Inmediatamente después del marcaje (t0) se observó el transportador en membrana plasmática. Tras 30 minutos de incubación a 37°C (t30), el NGFR-GLT1 marcado se acumuló en el interior celular.

Los resultados obtenidos mediante el uso de este abordaje en células MDCK transfectadas con NGFR-GLT1 pusieron nuevamente de manifiesto la existencia de una endocitosis constitutiva de GLT1 ya que el transportador marcado en membrana plasmática, como se pudo verificar observando su localización inmediatamente después de realizar dicho marcaje (t0), se internalizó completamente tras el restablecimiento del tráfico intracelular, lo que se conseguía al reincubar las células a una temperatura de 37°C durante 30 minutos (Figura 13B).

Todo ello nos llevó a postular que la acumulación de transportador intracelular observada se trataba única y exclusivamente de NGFR-GLT1 endocitado de manera constitutiva desde la membrana plasmática.

IV.1.3. El tratamiento con monensina produce una redistribución de GLT1 en la membrana plasmática de astrocitos.

El neurotransportador GLT1 se expresa de forma mayoritaria en la membrana plasmática de astrocitos desde donde realiza su función, es decir, la retirada del neurotransmisor de la hendidura sináptica. Por esta razón se decidió estudiar el comportamiento del neurotransportador en cultivos primarios de astrocitos de rata.

Dicho estudio se realizó utilizando un anticuerpo dirigido frente al extremo C-terminal del transportador generado en nuestro laboratorio, con el que se analizó GLT1 endógeno, y también mediante la nucleofección de estos astrocitos con la construcción HA-GLT1.

En primer lugar se observó que el patrón de distribución del transportador en la membrana plasmática de cultivos primarios de astrocitos era mucho más heterogéneo que el observado en células MDCK transfectadas, donde la distribución en membrana de GLT1 era homogénea en todas las células. Teniendo esto en cuenta, la cuantificación de efectos en experimentos llevados a cabo en estos cultivos primarios era, en general menos evidente. Sin embargo, el tratamiento con monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C) produjo una redistribución de GLT1 en la membrana plasmática de astrocitos e incluso la internalización parcial del transportador, tanto en el caso del transportador endógeno (Figura 14 A y B) como del nucleofectado (Figura 14 C y D). En efecto, se observó cómo, con respecto a la situación control, el transportador GLT1 se concentró en pequeños dominios visualizados como puntos fluorescentes distribuidos por la superficie celular y en algunas acumulaciones intracelulares.

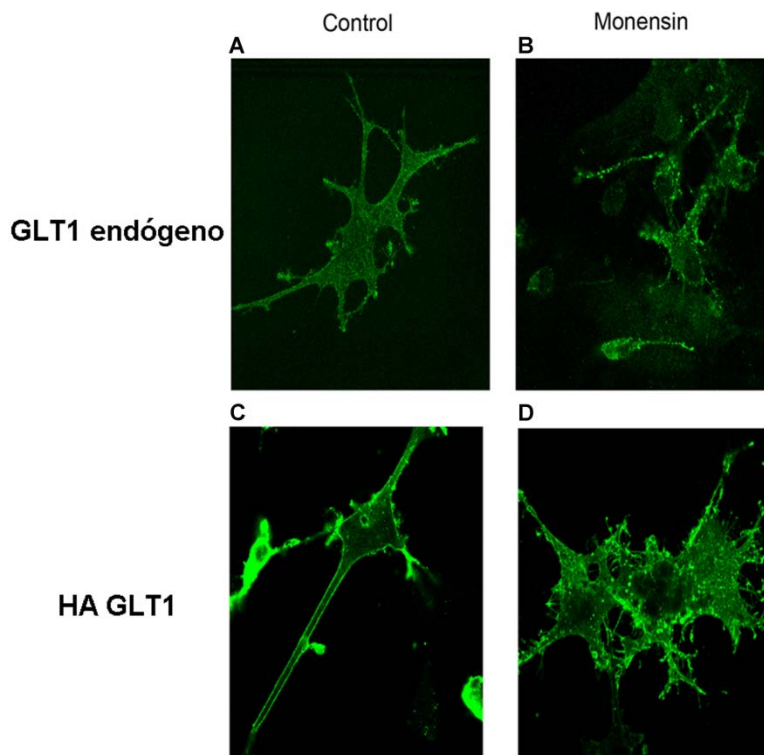


Figura 14. Estudio de GLT1 endógeno y HA-GLT1 nucleofectado en cultivos primarios de astrocitos de rata tratados con el agente ionóforo monensina.

Cultivos primarios de astrocitos de rata se cultivaron en cubreobjetos y fueron utilizados para estudiar, mediante inmunofluorescencia, la distribución del transportador GLT1 endógeno (A y B) o de HA-GLT1 nucleofectado (C y D). El transportador GLT1 endógeno se inmunolocalizó con un anticuerpo generado en nuestro laboratorio dirigido frente al extremo C-terminal del transportador. La construcción HA-GLT1 se nucleofectó como se describe en Materiales y Métodos y se visualizó, transcurridas 72 horas, mediante un anticuerpo específico del epítipo HA, por microscopía confocal. El tratamiento con monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C) produjo una redistribución del transportador GLT1 en la membrana plasmática de los astrocitos.

Estos resultados, si bien no pusieron de manifiesto de manera tan clara la endocitosis constitutiva de GLT1, ya que no se observaron los niveles de acumulación intracelular antes mencionada para células MDCK, si demostraron la existencia de un tráfico basal del transportador en los astrocitos; en este caso visualizado como una diferencia clara en la distribución de GLT1 con respecto a la situación control. Dentro de este tráfico basal, lógicamente estaría encuadrada la endocitosis constitutiva equivalente a la analizada en células MDCK aunque su visualización no resultó tan evidente seguramente debido a una diferente tasa de recambio del neurotransportador en la membrana plasmática de los astrocitos.

IV.1.4. NGFR-GLT1 marcado en membrana plasmática de astrocitos se endocita en condiciones basales.

Puesto que el tratamiento con monensina evidenció la existencia de un tráfico basal de GLT1 en astrocitos pero no puso directamente de manifiesto un proceso de endocitosis constitutiva desde membrana plasmática, resultó necesario recurrir de nuevo al marcaje de la proteína quimérica NGFR-GLT1. En este caso, cultivos primarios de astrocitos de rata fueron nucleofectados con la construcción NGFR-GLT1. El marcaje *in vivo* se realizó a 4°C y posteriormente se incubaron estos astrocitos a 37°C a distintos tiempos para restablecer el tráfico intracelular.

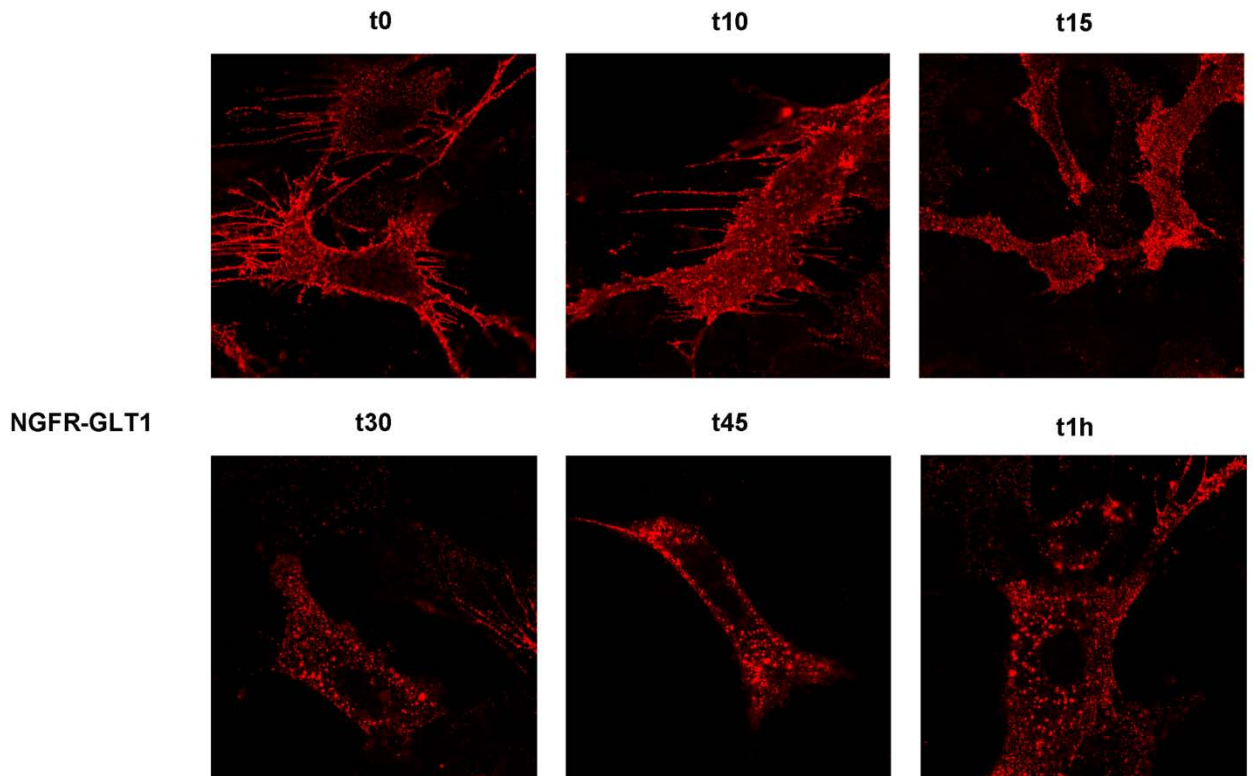


Figura 15. Marcaje *in vivo* en membrana plasmática de la proteína quimera NGFR-GLT1 en cultivos primarios de astrocitos.

Cultivos primarios de astrocitos se cultivaron en cubreobjetos para su posterior visualización en microscopio de fluorescencia. Estas células fueron nucleofectadas con la quimera NGFR-GLT1 y, 72 horas después, se procedió a su marcaje en membrana plasmática *in vivo* a 4°C, mediante el anticuerpo específico del receptor de NGF. Inmediatamente después de esta marcaje, se fijaron los astrocitos con PFA al 4% (t0). El resto de células se incubaron a 37°C a distintos tiempos (10, 15, 30, 45 min o 1h).

Como puede observarse en la figura 15, el patrón de distribución de NGFR-GLT1 en membrana plasmática de astrocitos presentó el mismo aspecto y la misma heterogeneidad que el descrito anteriormente para HA-GLT1 (t0). Sin embargo, en el caso de la proteína quimérica, si llegó a observarse de manera inequívoca una acumulación de transportador endocitado constitutivamente desde membrana plasmática. El proceso de endocitosis constitutiva fue claramente visible a partir de los 30 minutos de incubación a 37°C, y al cabo de una hora prácticamente la totalidad de transportador marcado en membrana se hallaba retenido en el interior celular. Esta última observación confirma que el tráfico intracelular de GLT1 en astrocitos no presenta la misma tasa de recambio que en células MDCK donde, transcurridos pocos minutos, ya puede observarse una clara acumulación de GLT1 intracelular.

En definitiva, los resultados expuestos hasta ahora, evidencian la existencia de un proceso de endocitosis constitutiva del transportador de glutamato GLT1 desde la membrana plasmática tanto en un sistema heterólogo, como son las células MDCK, como en un sistema mucho más cercano a su expresión glial fisiológica.

IV.2. El transportador de glutamato GLT1 endocitado constitutivamente se acumula en compartimentos endosomales tempranos.

Como se ha descrito en la Introducción, las proteínas de membrana endocitadas pasan al sistema endosomal que está compuesto por una red túbulo-vesicular muy dinámica desde la cual pueden reciclarse a membrana o pasar a degradación dependiendo del compartimento intracelular en donde se encuentren. La acumulación de neurotransportador observada y que evidenció la existencia de un proceso de endocitosis constitutiva hubo de caracterizarse, es decir, determinar exactamente la identidad de los compartimentos intracelulares en los cuales se estaba acumulando GLT1.

IV.2.1 El transportador GLT1 colocaliza parcialmente con el marcador de endosomas tempranos EEA1 tras el tratamiento con el agente ionóforo monensina.

Células MDCK transfectadas con la construcción HA-GLT1 fueron tratadas con el agente ionóforo monensina (35 μ M 30 minutos a 37°C), volviéndose a observar la internalización constitutiva del transportador desde la membrana plasmática. Las células se incubaron con el marcador de endosomas tempranos EEA1 (*Early Endosomes Antigen 1*) para determinar si GLT1 se localizaba en estos compartimentos intracelulares (Figura 16A). EEA1 es un factor de unión que interviene en la fusión de las membranas endosomales.

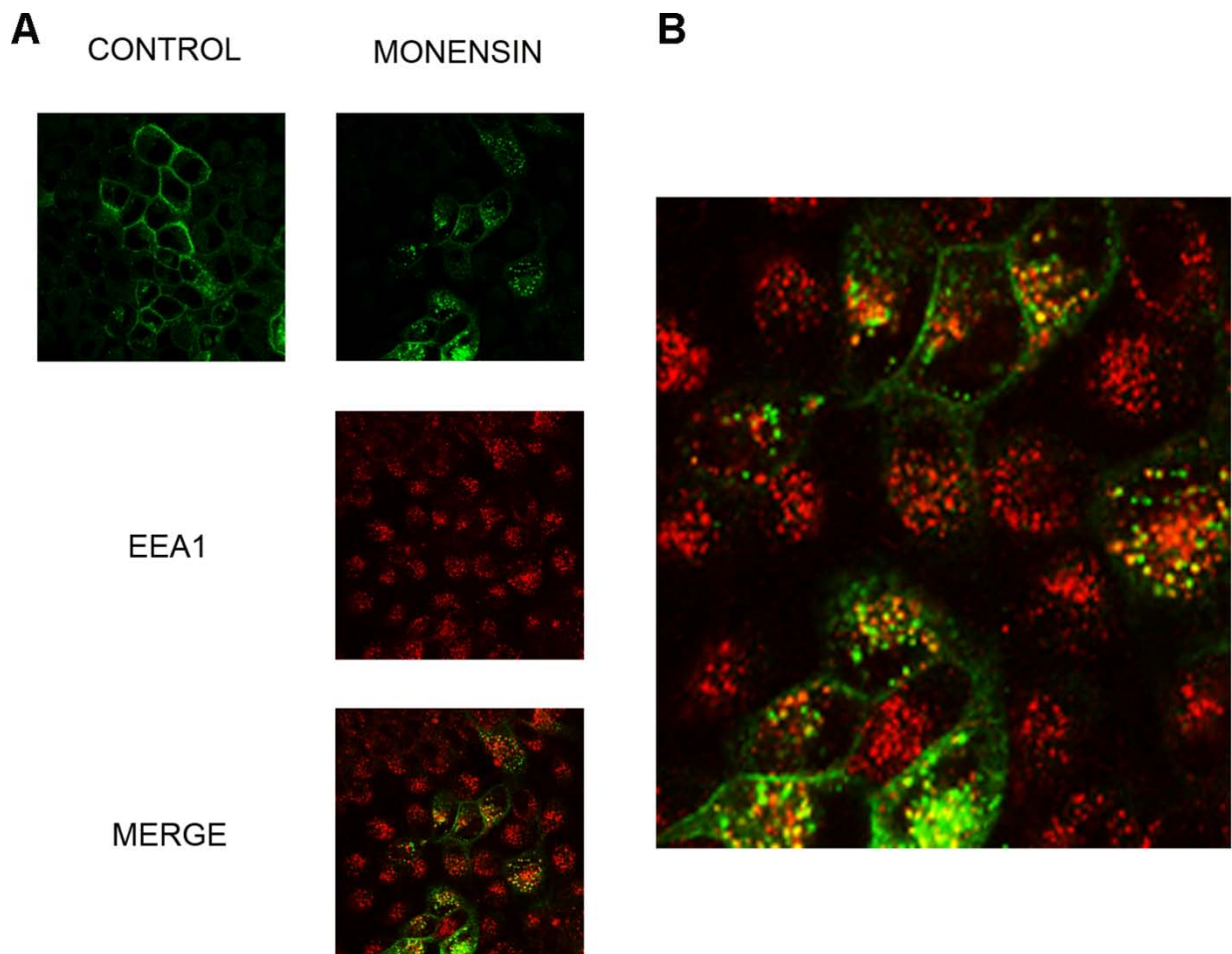


Figura 16. Estudio de la acumulación intracelular de GLT1 tras tratamiento con monensina mediante el uso del marcador de endosomas tempranos EEA1.

A: Células MDCK transfectadas con la construcción HA-GLT1 fueron tratadas, a las 48 horas, con el agente ionóforo monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C). Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas durante 1 hora con el marcador de endosomas tempranos EEA1 junto con el anticuerpo anti-HA, para el posterior análisis de colocalización por microscopia confocal mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluoróforos (rojo: EEA1 (Alexa 555) y verde: HA-GLT1 (Alexa 488)). **B:** La colocalización de HA-GLT1 internalizado con el marcador de endosomas tempranos EEA1 se visualizó como vesículas de color amarillo en la imagen de fusión.

Como puede observarse en la figura 16B, que corresponde a la zona reseñada en la Figura 16A, la acumulación intracelular de GLT1 se encontraba, al menos en parte, retenida en los endosomas tempranos EEA1 positivos tras el tratamiento de 30 minutos con el agente ionóforo monensina (la colocalización corresponde a las vesículas de color amarillo).

Para comprobar con mayor precisión la naturaleza de las vesículas donde se estaba acumulando GLT1 se recurrió a la coexpresión del neurotransportador con determinadas Rab GTPasas.

IV.2.2. El transportador GLT1 intracelular se localiza a los 15 minutos de tratamiento con monensina en vesículas Rab5 positivas.

Las Rab GTPasas constituyen un grupo de pequeñas GTPasas encargadas de garantizar un correcto destino de los cargos endocitados desde la membrana plasmática controlando la identidad de cada compartimento, la fusión vesicular así como su movilidad y el desensamblaje de las cubiertas proteicas, a través del reclutamiento de adaptadores, kinasas, fosfatasas y componentes del citoesqueleto (Stenmark, 2009).

En el presente estudio se utilizaron las Rab GTPasas para caracterizar de forma precisa la acumulación intracelular de GLT1 observada. En efecto, se dispuso de varias construcciones en las que distintas Rab GTPasas de especial interés por su localización y función como Rab5, Rab4, Rab11 y Rab7 (Figura 17) estaban conjugadas con un epítipo fluorescente (RFP o GFP) y se coexpresaron junto con el transportador GLT1 en células MDCK.

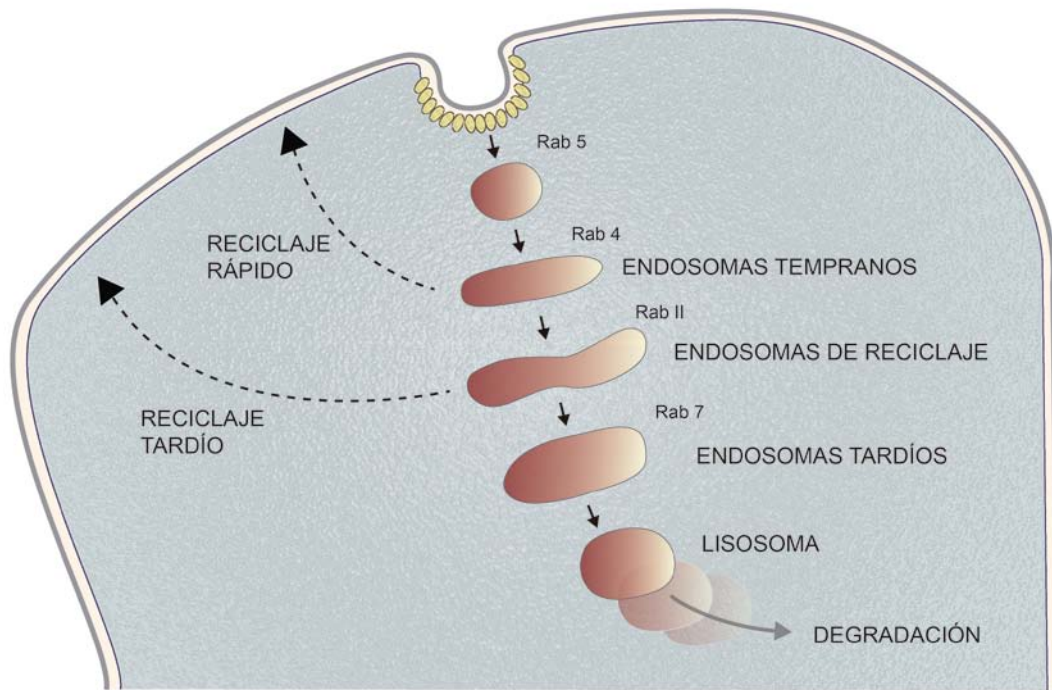


Figura 17. Esquema de la localización y función de las distintas Rab GTPasas empleadas en el estudio del tráfico intracelular basal de GLUT1.

Rab5 está localizada en endosomas tempranos y participa en la endocitosis y fusión de vesículas recubiertas de clatrina. Rab4 interviene en el proceso de reciclaje rápido desde endosomas tempranos. Rab7 permite la maduración de los endosomas tardíos y su fusión con los lisosomas. Rab11 participa en el proceso de reciclaje tardío desde endosomas específicos de reciclaje.

En primer lugar, se cotransfectaron células MDCK con las construcciones HA-GLT1 y RFP-Rab5. Esta GTPasa se localiza en endosomas tempranos e interviene en la endocitosis y la fusión de las vesículas recubiertas de clatrina (Stenmark, 2009). Como puede observarse en la figura 18, la acumulación intracelular de GLUT1 mostró una máxima colocalización con Rab5 transcurridos 15 minutos de tratamiento con monensina ($35 \mu\text{M}$ a 37°C). Al cabo de media hora, esta colocalización disminuyó considerablemente, indicando así el paso de GLUT1 a otros compartimentos endosomales. Este resultado, por otra parte, parece indicar que GLUT1 se estaba endocitando constitutivamente siguiendo la vía dependiente de clatrina.

Finalmente, resulta interesante señalar que el factor EEA1 presenta dominios de unión a Rab5 por lo que ambos se localizan mayoritariamente en los mismos compartimentos endosomales (Simonsen et al., 1998). Esto quiere decir que el marcaje con EEA1 y la colocalización con Rab5 pueden considerarse equivalentes.

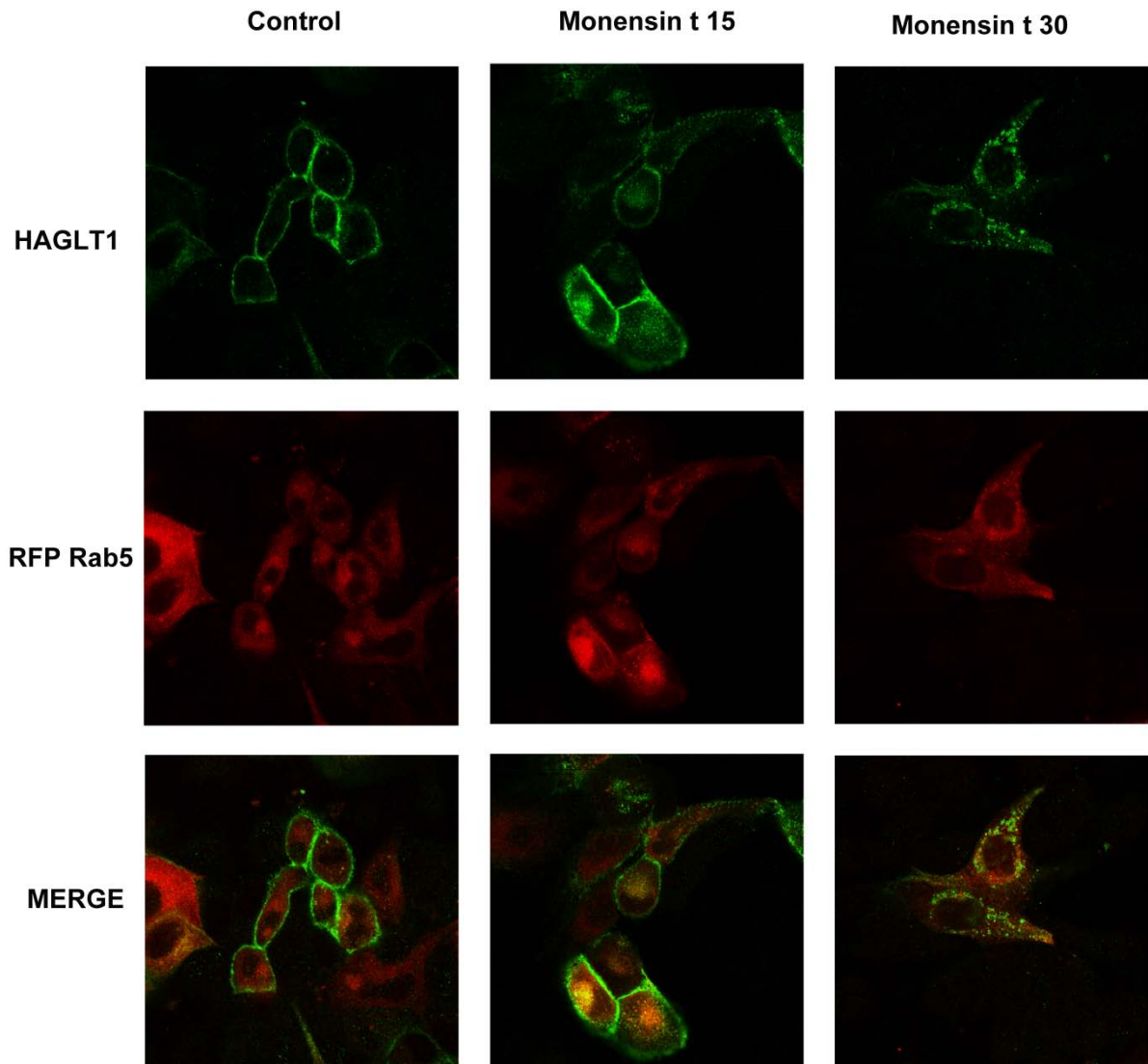


Figura 18. Estudio de la colocalización del transportador GLT1 internalizado constitutivamente con RFP-Rab5 en células MDCK.

Células MDCK cultivadas en cubreobjetos para su posterior análisis por microscopia confocal fueron cotransfectadas con las construcciones HA-GLT1 y RFP-Rab5. Dos días después estas células fueron tratadas con monensina (35 μ M a 37°C) durante 15 o 30 minutos y se realizó la inmunofluorescencia. El transportador HA-GLT1 se marcó con un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo de color verde (Alexa 488) mientras que la GTPasa Rab5 se hallaba acoplada al epitopo RFP (*Red Fluorescent Protein*) de emisión roja. La colocalización de ambas construcciones correspondía al color amarillo en la imagen de fusión visualizada en un microscopio de fluorescencia.

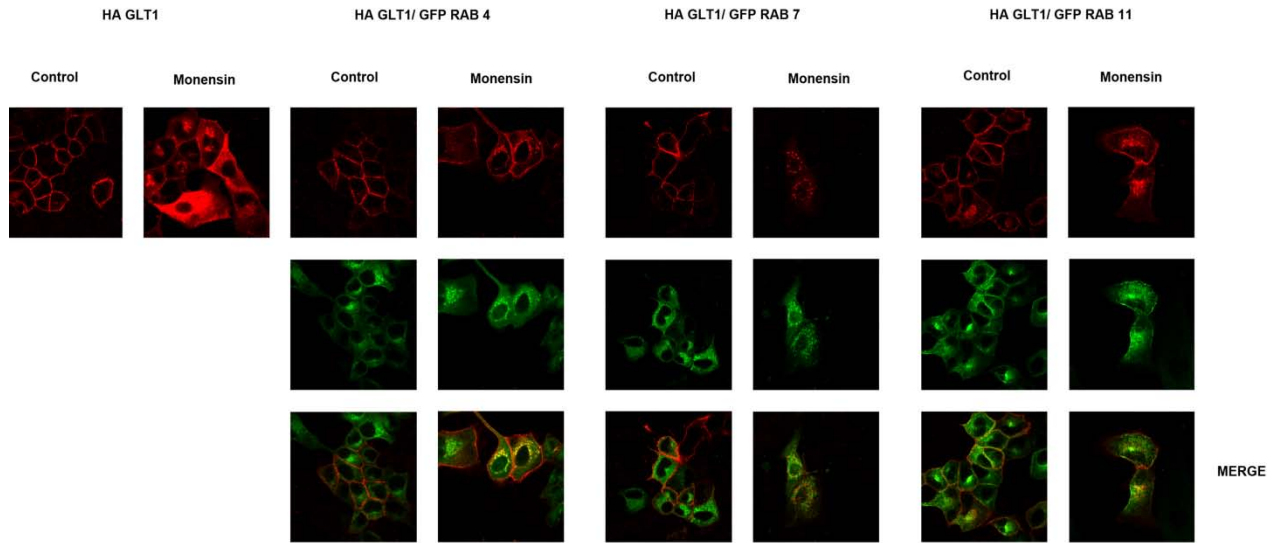
Los resultados hallados hasta ahora demuestran, por lo tanto, que el transportador GLT1 internalizado de manera constitutiva está tomando como vía de entrada al interior celular desde la membrana plasmática la vía de endocitosis dependiente de clatrina. Una vez endocitado, GLT1 pasa a los endosomas tempranos positivos para EEA1 y Rab5 desde donde se dirige a compartimentos intracelulares posteriores cuya naturaleza se describe a continuación.

IV.2.3. El transportador GLT1 endocitado constitutivamente queda retenido en endosomas tempranos de reciclaje rápido.

El siguiente paso en el estudio del transportador retenido intracelularmente fue la coexpresión en células MDCK de GLT1 con otras tres Rab GTPasas cuyas funciones en el sistema endosomal resultaban interesantes (Figura 17), esta vez unidas al epítipo GFP; GFP-Rab4, GFP-Rab7 y GFP-Rab11 (Figura 19A).

Rab4 interviene en el proceso de reciclaje rápido de proteínas endocitadas a membrana plasmática directamente desde los endosomas tempranos. Rab7 por su parte es la GTPasa encargada de la maduración de los endosomas tardíos y de su fusión con los lisosomas, donde estas proteínas pasan a degradación. Finalmente, Rab11 está involucrada en un proceso de reciclaje a membrana más tardío a través de endosomas específicos de reciclaje (Stenmark, 2009). Así pues, estas construcciones nos permitieron realizar un estudio más detallado del destino del transportador GLT1 endocitado constitutivamente.

A



B

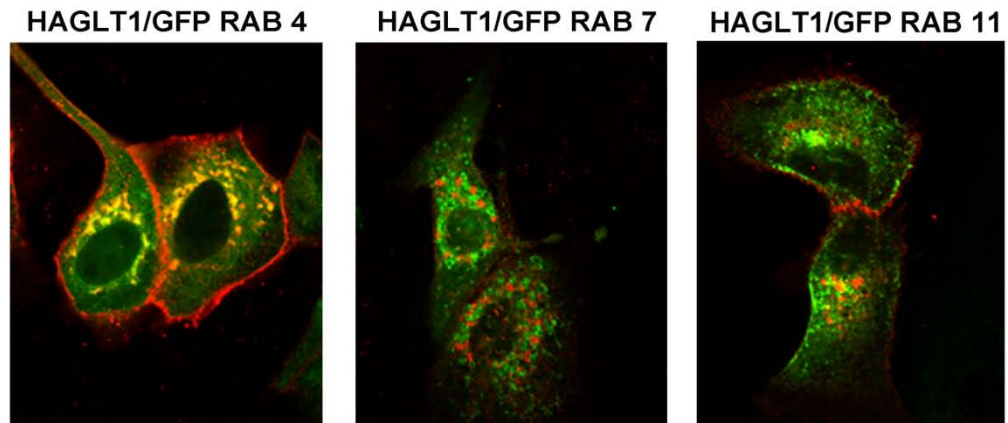


Figura 19. Co-expresión en células MDCK del transportador HA-GLT1 y las Rab GTPasas GFP-Rab4, GFP-Rab7 y GFP-Rab11.

A: Células MDCK fueron cotransfectadas con HA-GLT1 y GFP-Rab4/Rab7/Rab11 (*Green Fluorescent Protein*), respectivamente. Transcurridas 48 horas, se procedió al tratamiento con el agente ionóforo monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C). El marcaje del transportador GLT1 se realizó con un anticuerpo secundario unido al fluoróforo rojo (Alexa 555) mientras que las distintas Rab GTPasas se visualizaron en verde. **B:** La colocalización del transportador GLT1 endocitado constitutivamente con cada una de estas tres Rab GTPasas se analizó por microscopía confocal y correspondía a las vesículas de color amarillo.

Células MDCK cotransfectadas con HA-GLT1 y las GTPasas antes mencionadas fueron tratadas nuevamente con monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C). En la figura 19B se puede observar como el transportador GLT1 endocitado desde membrana plasmática colocalizó perfectamente con la GTPasa Rab4 y no así con las GTPasas Rab7 y Rab11. Este resultado indica de manera inequívoca que la acumulación de GLT1 internalizado constitutivamente se estaba reteniendo en los endosomas tempranos desde los cuales se realiza un proceso de reciclaje rápido a membrana plasmática y no en endosomas de reciclaje tardío o de degradación lisosomal. El reciclaje directo a membrana plasmática desde los endosomas tempranos se encontraba, lógicamente bloqueado debido a la acción del agente ionóforo monensina sobre el gradiente de protones.

Aunque el resultado hallado con Rab5 indica una clara implicación de la vía de endocitosis dependiente de clatrina, dada la complejidad existente en las distintas vías de entrada en células eucariotas, el siguiente paso en este estudio fue la caracterización de la o las vías de endocitosis por la cual el transportador GLT1 estaba internalizándose de manera constitutiva.

IV.3. El transportador de glutamato GLT1 se endocita constitutivamente por la vía dependiente de clatrina.

Las proteínas de membrana en células eucariotas pueden endocitarse a través de múltiples vías, siendo la vía mayoritaria y la mejor caracterizada la dependiente de clatrina. Si no hay dependencia de clatrina, entonces, la vía de endocitosis más importante es aquella en la que interviene la caveolina y que está estrechamente relacionada con las balsas lipídicas. En estas dos vías interviene la GTPasa dinamina en la formación y la escisión de la vesícula de endocitosis. Las vías de endocitosis independientes de clatrina y caveolina son minoritarias e involucran a una diversidad de pequeñas GTPasas (Mayor y Pagano, 2007).

IV.3.1. El tratamiento con sacarosa hipertónica bloquea el efecto de la monensina y estabiliza a GLT1 en membrana plasmática.

Los resultados hallados con Rab5 indicaron una dependencia de clatrina en la endocitosis constitutiva de GLT1 desde membrana plasmática. Con el objetivo de ratificar este dato y esclarecer una posible intervención de otras vías de endocitosis, se

recurrió a distintos inhibidores tanto de la vía dependiente de clatrina como de la dependiente de caveolina y balsas lipídicas. La sacarosa hipertónica ha sido descrita como un inhibidor de la vía de endocitosis dependiente de clatrina ya que el cambio que produce en la osmolaridad celular impide la formación y el ensamblaje de estas cubiertas proteicas. La filipina y la metil-beta-cilodextrina son, por otra parte, inhibidores de la vía dependiente de caveolina y balsas lipídicas ya que ambas unen y retiran el colesterol necesario para la formación de estos microdominios de membrana.

Células MDCK transfectadas con HA-GLT1 fueron pretratadas con estos inhibidores (Filipina: 5 µg/ml; Metil-beta-ciclodextrina: 10 mM; Sacarosa: 350 mM) durante 30 minutos a 37°C, tras lo cual se trataron con el agente ionóforo monensina (35 µM, 30 minutos a 37°C) para evidenciar el proceso de endocitosis constitutiva del transportador GLT1 desde membrana plasmática (Figura 20)

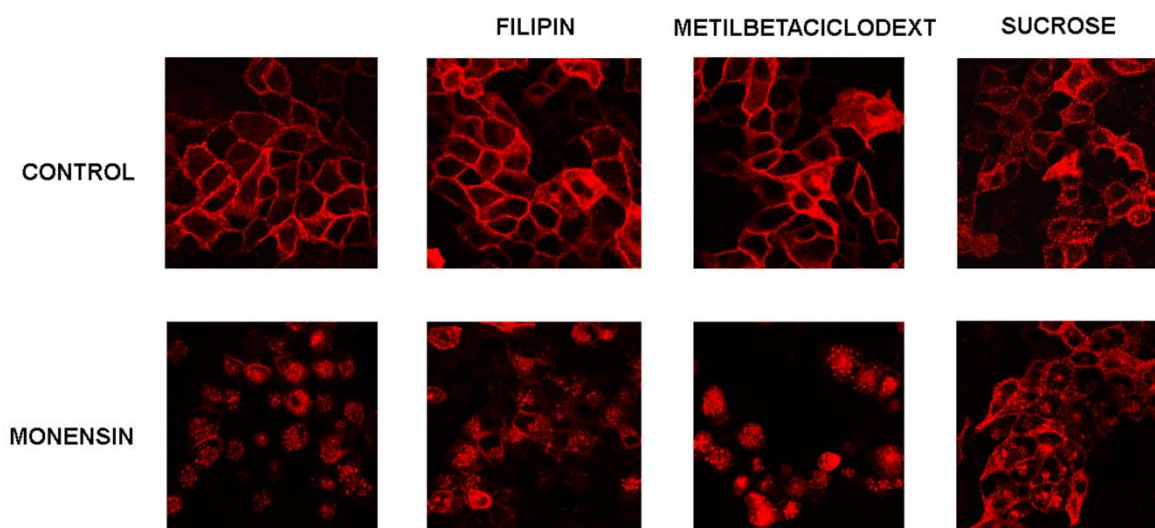


Figura 20. La sacarosa hipertónica bloquea la internalización de GLT1 producida por la monensina.

Células MDCK transfectadas con HA-GLT1, transcurridas 48 horas, fueron pretratadas durante 30 minutos con inhibidores de la vía de endocitosis dependiente de caveolina y balsas lipídicas (Filipina 5µg/ml y Metil-beta-ciclodextrina 10 mM) y con un inhibidor de la vía dependiente de clatrina (sacarosa 350 mM). La internalización de HA-GLT1 tras el tratamiento con monensina (35 µM, 30 minutos a 37°C) visible en microscopia confocal solo fue bloqueada por la sacarosa hipertónica.

En condiciones control GLT1 se halló homogéneamente distribuido en la membrana plasmática y ningún pretratamiento afectó a su localización. La monensina volvió a producir la acumulación de GLT1 intracelular y tan sólo la sacarosa hipertónica fue capaz de bloquear este efecto y estabilizar al neurotransportador en la membrana plasmática de las células. Este resultado vuelve a señalar de manera inequívoca una dependencia de la vía de clatrina mientras que parece descartar la intervención de vías alternativas dependientes de caveolina y balsas lipídicas en la endocitosis constitutiva de GLT1.

IV.3.2. El tratamiento con sacarosa hipertónica impide la internalización de NGFR-GLT1 en condiciones basales.

Puesto que el proceso de endocitosis constitutiva de GLT1 fue puesto de manifiesto a través de dos abordajes distintos, el tratamiento con el agente ionóforo monensina y el marcaje en membrana plasmática de NGFR-GLT1, resultó necesario verificar la dependencia de la vía de endocitosis dependiente de clatrina con esta construcción.

Para ello se expresó la proteína quimérica NGFR-GLT1 en células MDCK y se realizó el marcaje *in vivo* en membrana a 4°C, tras lo cual se incubaron las células a 37°C para restablecer el tráfico intracelular (Figura 21).

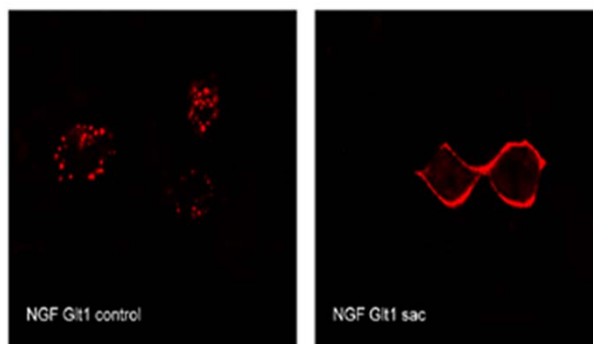


Figura 21. La quimera NGFR-GLT1 se estabiliza en membrana tras el tratamiento con sacarosa hipertónica.

Células MDCK fueron transfectadas con la proteína quimérica NGFR-GLT1 que se marcó, transcurridas 48 horas, en membrana plasmática *in vivo* a 4°C, mediante el anticuerpo específico del receptor NGF y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 555. Tras el marcaje se incubaron estas células a 37°C durante 30 minutos en condiciones control y en presencia de sacarosa hipertónica (350 mM). El resultado de este experimento se visualizó en microscopio de fluorescencia. Nótese como el tratamiento con sacarosa hipertónica estabilizó a NGFR-GLT1 en membrana plasmática.

En condiciones control, al cabo de 30 minutos de incubación a 37°C, la totalidad del transportador marcado en membrana plasmática se encontraba retenido en compartimentos intracelulares. Sin embargo si la incubación se realizaba en presencia de sacarosa hipertónica (350 mM) se observó como NGFR-GLT1 permanecía estabilizado en membrana plasmática.

Este resultado demuestra, a través de otro abordaje experimental, la dependencia de la vía de endocitosis dependiente de clatrina en el proceso de internalización constitutiva del transportador de glutamato GLT1 desde membrana plasmática.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados hasta ahora en lo que refiere a la vía de endocitosis que GLT1 utiliza para su tráfico basal, se puede afirmar que el transportador se endocita constitutivamente por la vía dependiente de clatrina aunque no es posible excluir otras posibilidades dada la complejidad y versatilidad de las distintas vías de endocitosis en células eucariotas.

IV.4. La endocitosis constitutiva de GLT1 es dependiente de ubiquitinación.

Una vez demostrada la existencia de un proceso de endocitosis constitutiva de GLT1 y teniendo en cuenta que datos previos demostraron que el transportador se ubiquitina y que dicho marcaje interviene en su tráfico regulado por PKC (Sheldon et al., 2008; González-González et al., 2008), resultó lógico plantearse el papel de la ubiquitinación de GLT1 en su tráfico intracelular basal. El estudio de la dependencia de ubiquitinación de la endocitosis constitutiva de GLT1 se planteó mediante distintos abordajes que se describen a continuación:

IV.4.1. La inhibición de la enzima E1 produce una retención de NGFR-GLT1 en la membrana plasmática.

Se realizó un marcaje *in vivo* de GLT1 en membrana plasmática mediante la construcción NGFR-GLT1. Como se puso en evidencia en el experimento descrito en el apartado 1.2, el transportador se endocitó totalmente en condiciones control al restablecer el tráfico intracelular incubando las células a 37°C. Para ver si el proceso de endocitosis constitutiva involucraba a la ubiquitinación del transportador se utilizó un inhibidor específico de la enzima E1, PYR41 (Yang et al., 2007). Esta enzima es la

encargada de activar las moléculas de ubiquitina libre y es indispensable para que esta modificación postraducciona tenga lugar (ver Figura 10 en el apartado Introducción).

Células MDCK transfectadas con NGFR-GLT1 fueron pretratadas con PYR41 (50 μ M durante 1 y 2 horas a 37°C), tras lo cual se procedió al marcaje *in vivo* de NGFR-GLT1 en membrana a 4°C. En condiciones control se observó la acumulación intracelular de transportador que evidenció nuevamente la endocitosis constitutiva de GLT1, proceso por otra parte muy dinámico ya que transcurridos tan sólo 15 minutos se observó la presencia de quimera en compartimentos intracelulares. La inhibición de la enzima E1 produjo una retención de NGFR-GLT1 en membrana plasmática que no se modificó ni a los 15 ni a los 30 minutos. Transcurrido este tiempo, prácticamente todo el transportador se mantenía en la membrana plasmática (Figura 22).

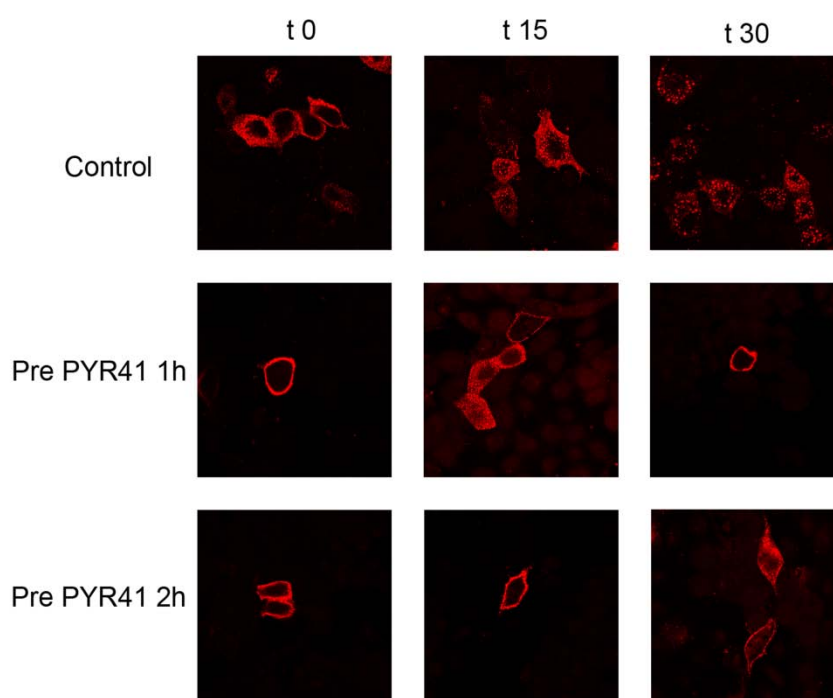


Figura 22. Estudio del efecto de la inhibición de la enzima E1 sobre la internalización de la proteína quimera NGFR-GLT1.

Células MDCK fueron transfectadas con la quimera NGFR-GLT1 y, después de dos días, parte de ellas se pretrataron con el inhibidor específico de la enzima E1 PYR41 (50 μ M a 37°C) durante 1 y 2 horas, respectivamente, además de células control, tratadas con el vehículo. Tras este pretratamiento, se procedió al marcaje en membrana plasmática *in vivo* a 4°C con el anticuerpo anti-NGFR. Inmediatamente después del marcaje (t0), NGFR-GLT1 se encontraba en membrana plasmática. Se incubaron el resto de células a 37°C durante dos tiempos distintos, 15 y 30 minutos. El análisis de los resultados obtenidos se realizó por microscopía confocal. Nótese como la inhibición de la actividad de la E1 bloqueó la internalización basal del transportador.

Este resultado demostró un papel relevante del proceso de ubiquitinación en la endocitosis constitutiva del transportador GLT1. En efecto, el bloqueo de la enzima E1 impide el primer paso en el proceso de ubiquitinación es decir, la activación de las moléculas de ubiquitina libres en la célula y su posterior bloqueo fue la causa de la estabilización del transportador en membrana plasmática.

IV.4.2. La inhibición de la enzima E1 produce un incremento de GLT1 en la superficie celular de astrocitos en cultivo primario.

En este punto, quisimos contrastar los resultados obtenidos en células MDCK recurriendo de nuevo a cultivos primarios de astrocitos. El objetivo fue estudiar el efecto de la inhibición de la ubiquitinación en la distribución de GLT1 en su membrana plasmática. Con el fin de cuantificar este efecto, se realizó un marcaje del transportador en membrana con el reactivo sulfo-NHS-SS-biotina. Este reactivo es impermeable a la membrana y se conjuga únicamente con las proteínas situadas en la superficie celular y por lo tanto permite su cuantificación tras ser precipitadas con estreptavidina agarosa.

Astrocitos nucleofectados con HA-GLT1 fueron pretratados durante 1 hora a 37°C (50 μ M) con PYR41, inhibidor específico de la enzima E1, tras lo cual se trataron con el agente ionóforo monensina (35 μ M 30 minutos a 37°C). Una vez realizado este tratamiento se procedió al marcaje de GLT1 en la superficie celular con el reactivo sulfo-NHS-SS-biotina. La cantidad de GLT1 presente en cada caso en membrana plasmática se determinó por su detección en *western blot*.

Se pudo observar que la cantidad de neurotransportador biotinilado, es decir presente en membrana plasmática, fue mayor para aquellos astrocitos que habían sido pretratados con el inhibidor PYR41 ya fuese en el caso control o para el tratamiento con monensina (Figura 23 “Proteína biotinilada”).

Las diferencias observadas en la cantidad de GLT1 marcado en la superficie celular no fueron debidas a distintos niveles de expresión de la proteína ya que se registró la misma cantidad de transportador en todos los casos en un lisado celular (Figura 23 (Lisados)).

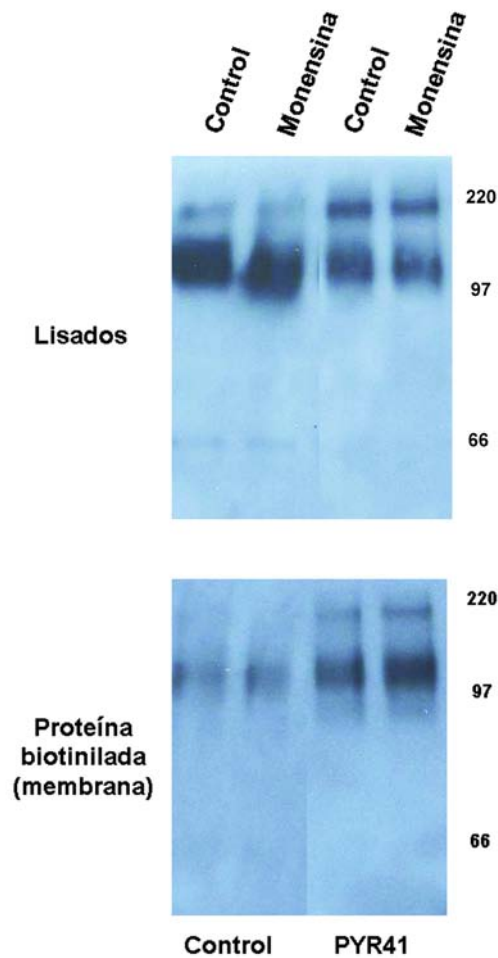


Figura 23. Estudio del efecto de la inhibición de la actividad de la enzima E1 sobre la expresión del transportador GLT1 en la superficie celular de astrocitos.

Cultivos primarios de astrocitos fueron nucleofectados con HA-GLT1. Transcurridas 72 horas se llevó a cabo el ensayo con estas células que se analizó por inmunotransferencia con el anticuerpo anti-HA. En todos los casos se observaron los mismos niveles de expresión de transportador en los lisados celulares. Se pretrataron los astrocitos con el inhibidor específico de la enzima E1, PYR41 (50 μ M, 1 hora a 37°C) tras lo cual se procedió al tratamiento con monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C). Finalmente se realizó el marcaje de las proteínas situadas en superficie celular de los astrocitos con el reactivo sulfo-NHS-SS-biotina. Se observó como la inhibición de la actividad de la E1 produjo una mayor cantidad de proteína biotinilada tanto en el caso control como tras el tratamiento con el agente ionóforo monensina.

De forma similar a lo obtenido en el caso de la construcción NGFR-GLT1, este resultado demostró una clara dependencia de ubiquitinación. La inhibición de la primera etapa de este proceso se tradujo en un aumento de GLT1 presente en membrana plasmática de los astrocitos, incluso en el caso control en el que no se está alterando el tráfico intracelular de la célula. Esto quiere decir que la endocitosis constitutiva, y por lo

tanto el tráfico basal intracelular del neurotransportador requiere, en astrocitos primarios, del correcto funcionamiento de la maquinaria de ubiquitinación.

Como ya se ha mencionado, la ubiquitinación en células de mamífero puede ser directa, es decir, que se ubiquitina sólo la proteína diana, o bien indirecta, donde dicho marcaje se realiza sobre proteínas asociadas o incluso de componentes de la maquinaria endocítica. Mediante la inhibición de la enzima E1 se demostró un papel relevante de la ubiquitinación en la endocitosis constitutiva de GLT1 aunque no se podía discernir si este marcaje fue de tipo directo o indirecto.

IV.5. La endocitosis constitutiva de GLT1 es dependiente de ubiquitinación de lisinas intracelulares en su extremo carboxilo.

El marcaje por ubiquitina se realiza mediante la unión de este polipeptido de 76 aminoácidos a residuos de lisina de las proteínas diana. El neurotransportador GLT1 presenta 16 residuos de lisina expuestos hacia el espacio intracelular, 4 en su región amino terminal, 5 situados en bucles intracelulares y 7 en la región carboxilo terminal (Figura 24).

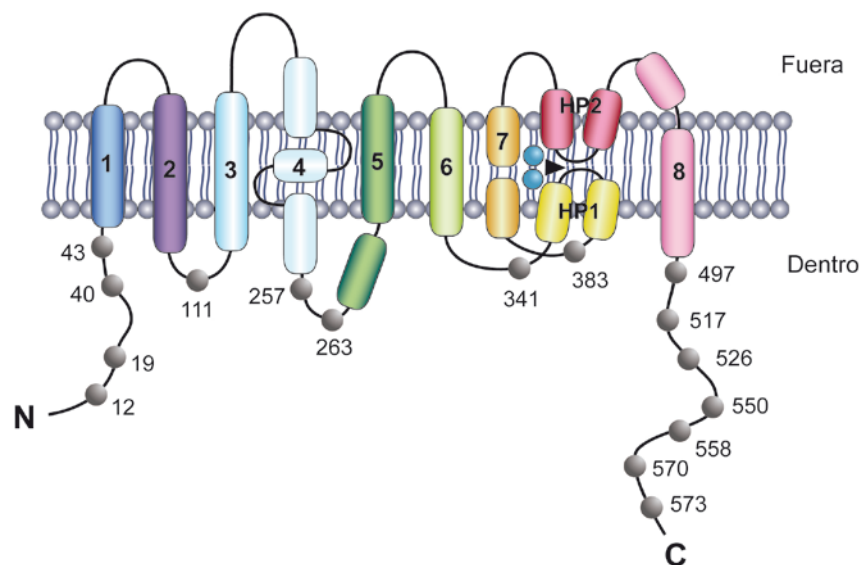


Figura 24. Esquema del transportador GLT1 donde se representan los 16 residuos intracelulares de lisina.

El transportador de glutamato GLT1 posee 16 residuos de lisina expuestos hacia el interior celular; 4 en la región amino terminal (residuos 12, 19, 40 y 43), 5 situados en bucles intracelulares (residuos 111, 257, 263, 341 y 383) y 7 en la región carboxilo terminal (residuos 497, 517, 526, 550, 558, 570 y 573).

Datos previos han demostrado que los últimos siete residuos de lisina del extremo carboxilo del transportador son los que intervienen en la endocitosis de GLT1 tras activación de la PKC con esteres de forbol, más concretamente los residuos 517 y 526 (Sheldon et al., 2008; González-González et al., 2008).

IV.5.1. El tratamiento con monensina no produce internalización del mutante GLT1 7KR.

En el presente estudio se quiso determinar el papel de los siete residuos de lisina del extremo carboxilo en la endocitosis constitutiva de GLT1. Para ello se recurrió a la utilización del mutante GLT1 7KR donde se cambiaron las siete lisinas del extremo carboxilo a arginina.

Células MDCK transfectadas con GLT1 nativo y con el mutante GLT1 7KR fueron tratadas con monensina (35 μ M a 37°C) a distintos tiempos. En el caso control ambas proteínas se hallaron homogéneamente localizadas en membrana plasmática (Figura 25, control). Sin embargo, el tratamiento con monensina produjo una internalización muy temprana (ya visible a los 5 min) de GLT1 nativo que no se observó para el mutante GLT1 7KR, incluso después de transcurridos 30 min de tratamiento (Figura 25).

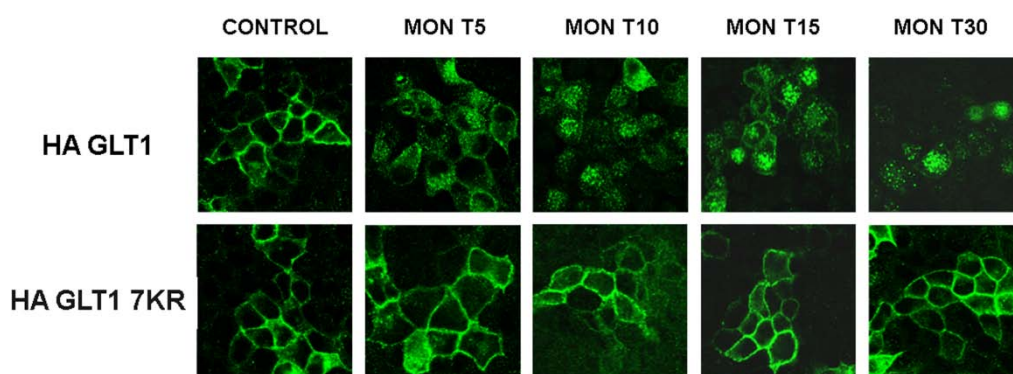


Figura 25. Efecto del agente ionóforo monensina sobre el mutante HA-GLT1 7KR en células MDCK.

Células MDCK se transfectaron con HA-GLT1 y el mutante HA-GLT1 7KR en el que las siete lisinas del extremo carboxilo fueron mutadas a arginina. Dos días después, estas células fueron tratadas con monensina (35 μ M a 37°C) a distintos tiempos (5, 10, 15 o 30 minutos). Tras este tratamiento se realizó la inmunofluorescencia y se visualizaron los resultados por microscopía confocal.

Este resultado demostró en el caso del tráfico intracelular basal de GLT1, un papel relevante de los siete residuos de lisina de su extremo carboxilo equiparable seguramente al que desempeñan en la endocitosis regulada por PKC, es decir, que su ubiquitinación es condición necesaria para la internalización constitutiva del transportador.

Para comprobar esta observación se recurrió de nuevo al marcaje *in vivo* del neurotransportador en membrana plasmática gracias a la construcción NGFR-GLT1.

IV.5.2. NGFR-GLT1 7KR marcado en membrana no se internaliza tras el restablecimiento del tráfico intracelular.

Con el fin de estudiar el comportamiento del mutante GLT1 7KR carente de los residuos de lisina en el extremo carboxilo, se generó el mutante NGFR-GLT1 7KR con el fragmento codificante del receptor NGF en su extremo amino expuesto hacia el exterior celular, lo que posibilitó su marcaje en membrana plasmática.

Células MDCK transfectadas con NGFR-GLT1 y con NGFR-GLT1 7KR se marcaron *in vivo* a 4°C. Tanto la proteína nativa como la mutante se localizaron homogéneamente distribuidas en la membrana plasmática de estas células (t0). Al cabo de 15 minutos a 37°C sin embargo, el acúmulo intracelular observado para GLT1 nativo no se detectó para GLT1 7KR el cual permaneció en su totalidad en membrana. Transcurridos 30 minutos, la proteína nativa continuó localizada en el interior celular agrupada, esta vez, en acumulaciones de mayor tamaño. El mutante GLT1 7KR se localizó mayoritariamente en membrana plasmática aunque cabe señalar que tras media hora de incubación a 37°C se vieron algunas células en las que esta proteína comenzaba a ser internalizada (Figura 26).

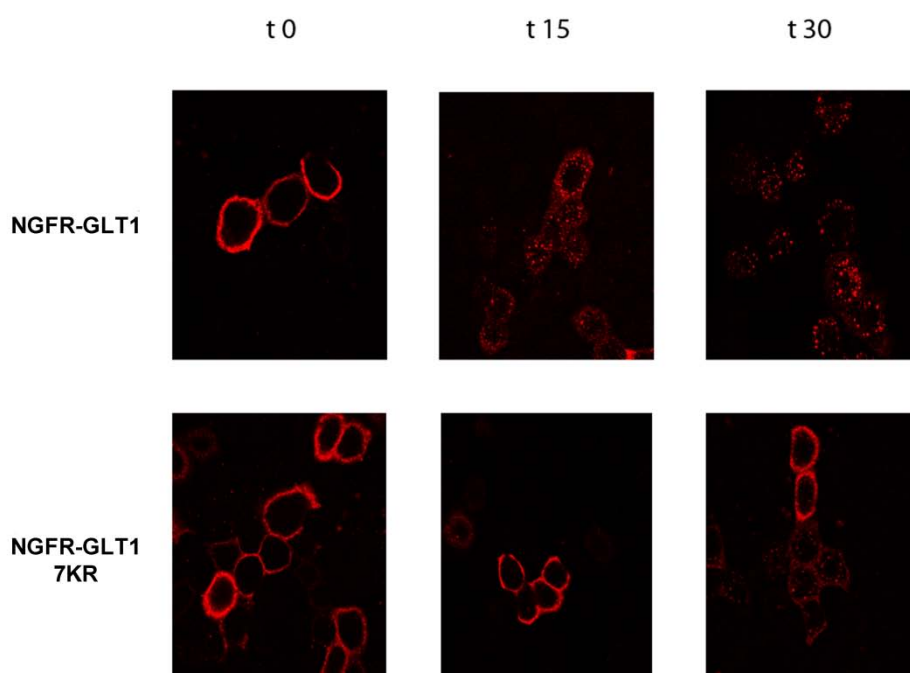


Figura 26. Marcaje *in vivo* en membrana plasmática de las quimeras NGFR-GLT1 y NGFR-GLT1 7KR en células MDCK.

Células MDCK transfectadas con las quimeras NGFR-GLT1 y el mutante NGFR-GLT1 7KR, carente de las siete lisinas del extremo carboxilo, a las 48 horas, se marcaron *in vivo* a 4°C. Inmediatamente después del marcaje (t0), ambas proteínas se hallaban localizadas en membrana plasmática. Se realizaron incubaciones a 37°C durante 15 o 30 minutos y se visualizaron los resultados en el microscopio de fluorescencia.

Estos resultados, al igual que los derivados del tratamiento con monensina, evidencian la importancia de los siete residuos de lisina del extremo C-terminal del transportador en su tráfico intracelular basal y vuelven a poner de manifiesto el papel de la ubiquitinación en este proceso. El hecho de que el mutante NGFR-GLT1 7KR se internalice al cabo de los 30 minutos de incubación, aunque sea a un nivel muy inferior que el transportador nativo, sugiere la existencia de vías de entrada alternativas que probablemente no requieran de la ubiquitinación como señal.

IV.5.3. NGFR-GLT1 7KR permanece estable en la membrana plasmática de astrocitos más tiempo que el transportador nativo.

Una vez más, para reforzar los resultados obtenidos en células MDCK, se procedió a estudiar el comportamiento de la quimera NGFR-GLT1 7KR en la membrana plasmática de astrocitos. En efecto, se nucleofectaron estas células con las

construcciones NGFR-GLT1 y NGFR-GLT1 7KR y se marcaron los transportadores en membrana plasmática a 4°C, condiciones en las cuales se encontraba paralizado el transporte intracelular.

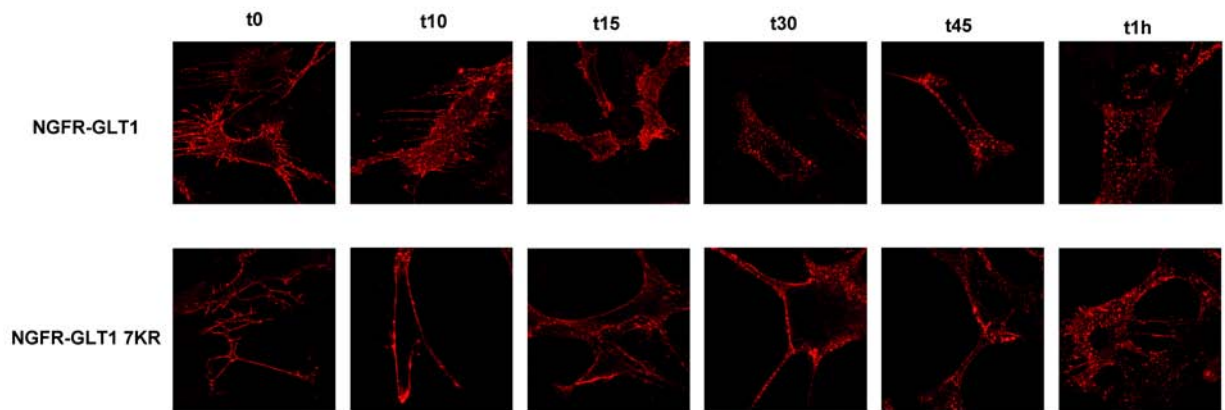


Figura 27. Marcaje *in vivo* en membrana plasmática de las proteínas quimera NGFR-GLT1 y NGFR-GLT1 7KR en cultivos primarios de astrocitos.

Astrocitos fueron nucleofectados con las construcciones NGFR-GLT1 y NGFR-GLT1 7KR que, 72 horas después, se marcaron en membrana plasmática *in vivo* a 4°C, gracias al anticuerpo específico del receptor NGF. Ambas proteínas se localizaban en membrana plasmática inmediatamente después del marcaje (t0). Se realizaron distintos tiempos de incubación a 37°C (10, 15, 30, 45 minutos o 1 hora). El análisis de los resultados obtenidos se llevo a cabo mediante microscopía confocal.

Como puede observarse en la Figura 27, NGFR-GLT1 se internalizó de manera evidente a partir de los 30 minutos de incubación a 37°C. El mutante NGFR-GLT1 7KR permaneció estable en la membrana plasmática de los astrocitos durante más tiempo, no apreciándose una endocitosis constitutiva clara salvo tras una hora de incubación. Este resultado, al igual que el obtenido en células MDCK con las quimeras NGFR-GLT1 indica, en condiciones más próximas a la expresión glial fisiológica del transportador de glutamato, una intervención del proceso de ubiquitinación en la endocitosis constitutiva de GLT1 a través de sus residuos de lisina del extremo carboxilo. El hecho de que el mutante NGFR-GLT1 7KR, carente de estos siete residuos, acabase por endocitarse planteó en astrocitos también, la existencia de una vía de endocitosis constitutiva alternativa no dependiente del proceso de ubiquitinación.

Una vez demostrada la implicación del extremo carboxilo de GLT1 en el proceso ubiquitinación necesario para la internalización y el tráfico basal del

neurotransportador, se decidió averiguar la importancia relativa de cada una de estas siete lisinas en la endocitosis constitutiva de GLT1 y para ello se generaron y estudiaron nuevos mutantes que se exponen a continuación:

IV.5.4. Los residuos 517 y 526 restablecen la internalización de GLT1 tras el tratamiento con monensina.

A partir de la construcción HA-GLT1 7KR se generaron distintos mutantes en los que, de manera progresiva, se fueron reintroduciendo una a una las lisinas del extremo carboxilo y fueron expresados en células MDCK. En condiciones control todos ellos se localizaron en membrana plasmática al igual que GLT1 nativo. Tras el tratamiento con monensina se pudo comprobar que fue a partir de la reintroducción de la lisina 517 (caso 3) cuando se observó un claro restablecimiento de la internalización análoga a la del transportador nativo (Figura 28).

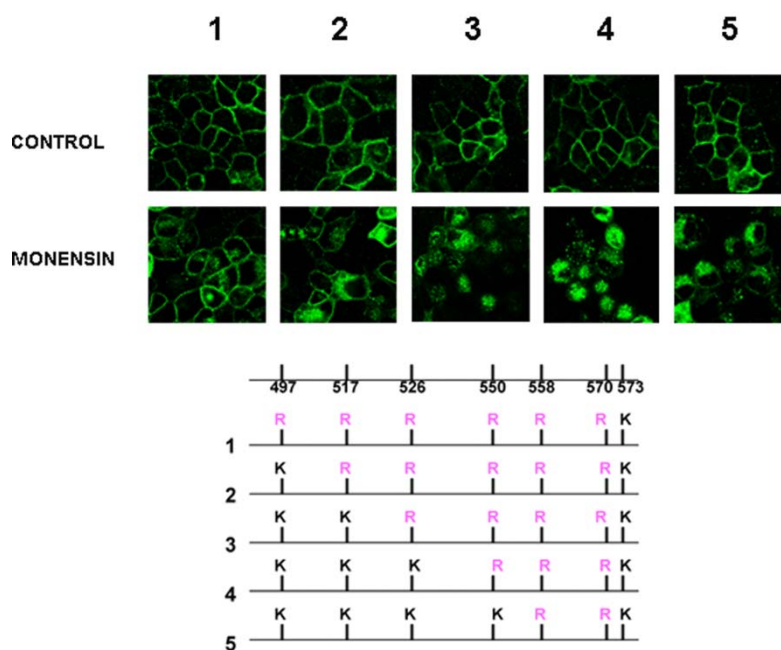


Figura 28. Estudio del efecto del agente ionóforo monensina sobre los mutantes de reintroducción progresiva.

A partir del mutante HA-GLT1 7KR se generaron los mutantes de reintroducción progresiva en los que se fueron reintroduciendo una a una las lisinas del extremo carboxilo del transportador GLT1. Estas construcciones se transfectaron en células MDCK cultivadas en cubreobjetos. A las 48 horas se trataron estas células con monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C) y se observaron los resultados en microscopio de fluorescencia.

Por otra parte, y usando también como base el mutante HA-GLT1 7KR, se generaron mutantes de reintroducción única, en los que sólo se reintrodujo una de las lisinas en cada construcción. En este caso se pretendió determinar la importancia relativa de cada residuo individualmente. Como puede observarse en la figura 29, tan sólo la reintroducción de los residuos 517 y 526 (HA-GLT1 R517K y HA-GLT1 R526K) fueron capaces de restablecer la internalización del neurotransportador tras el tratamiento con el agente ionóforo.

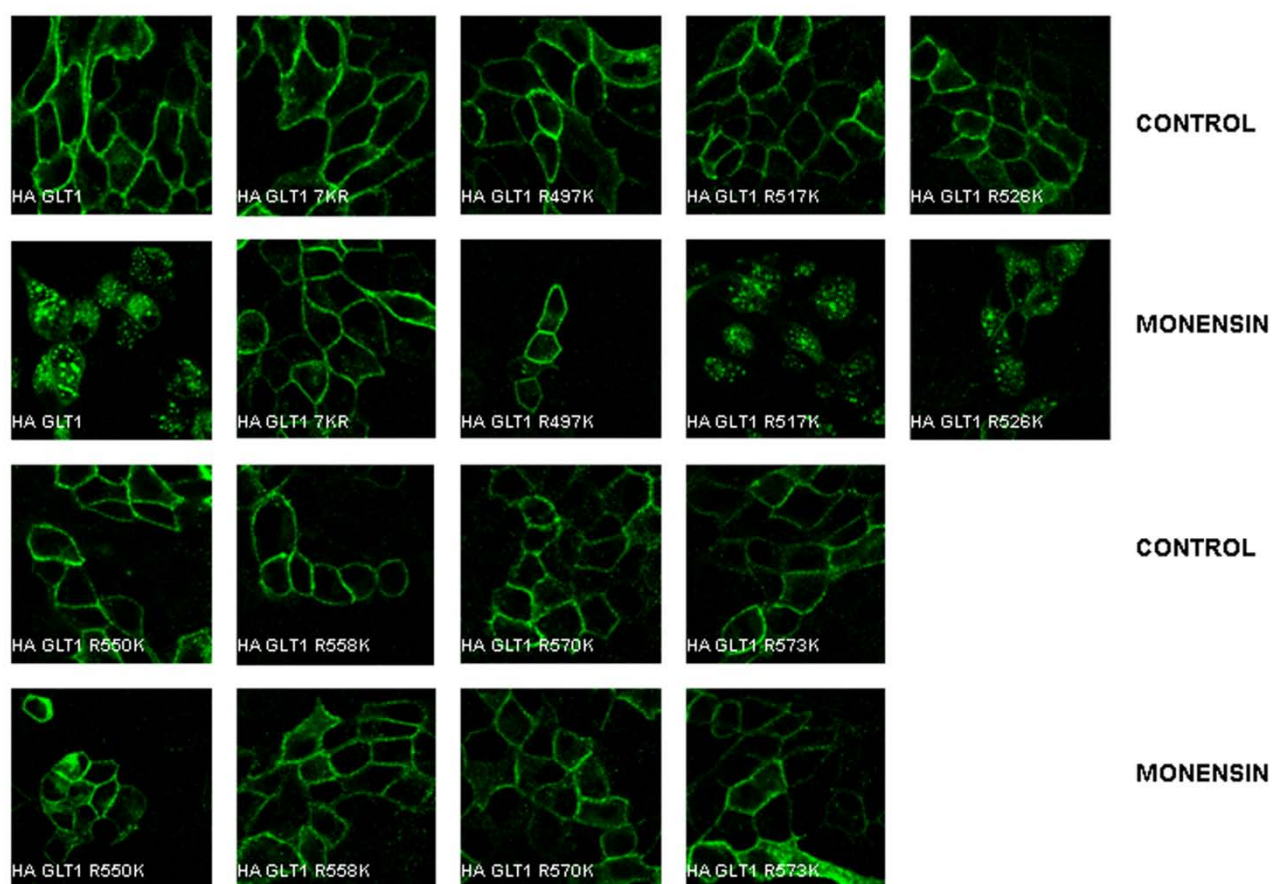


Figura 29. Estudio del efecto del agente ionóforo monensina sobre los mutantes de reintroducción única.

A partir del mutante HA-GLT1 7KR se generaron los siete mutantes de reintroducción única en los que se reintrodujeron solamente un residuo de lisina en cada construcción. Todos ellos, al igual que HA-GLT1 nativo y el mutante HA-GLT1 7KR, se transfectaron en células MDCK. Dos días después estas células fueron tratadas con monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C) y se realizó el montaje de las distintas inmunofluorescencias que fueron analizadas por microscopía confocal.

Los resultados hallados con estos mutantes apoyaron que, al igual que la endocitosis regulada por PKC, la endocitosis constitutiva de GLT1 es dependiente de la ubiquitinación de las lisinas de su extremo carboxilo y que son, en este caso también, los residuos 517 y 526 los de mayor importancia en el proceso.

En definitiva, el transportador de glutamato GLT1 está sujeto a un proceso de endocitosis constitutiva regulado por la ubiquitinación de los residuos de lisina de su extremo carboxilo y especialmente por las lisinas 517 y 526, cuya vía principal de entrada a la célula es dependiente de clatrina. Es importante recordar que no se pudo descartar la existencia de una vía de endocitosis constitutiva alternativa que parece no depender del proceso de ubiquitinación. Por otra parte, el transportador endocitado constitutivamente se está acumulando en endosomas tempranos de reciclaje rápido. El siguiente paso en nuestro estudio fue poner de manifiesto de manera directa la existencia de dicho proceso de reciclaje de GLT1 a membrana plasmática.

IV.6. El transportador de glutamato GLT1 endocitado constitutivamente está sujeto a un proceso de reciclaje a membrana plasmática.

El destino de toda proteína de membrana endocitada puede ser su degradación o bien su reciclaje de vuelta a membrana plasmática. De esta forma, junto con la aportación de la proteína sintetizada *de novo*, queda determinado el nivel de actividad que cualquier proteína ejerce en la membrana plasmática.

En el caso del transportador de glutamato GLT1 este reciclaje desempeñaría un papel relevante en la eficacia con la que se retira el glutamato de la hendidura sináptica y consiguientemente en evitar daños neuronales por excitotoxicidad. Evidenciar la existencia de un proceso de reciclaje requirió los siguientes abordajes:

IV.6.1. NGFR-GLT1 endocitado constitutivamente vuelve a membrana plasmática a tiempos largos de incubación a 37°C.

Hasta el momento, se ha descrito como la quimera NGFR-GLT1 resultó de gran utilidad para estudiar la endocitosis constitutiva del transportador ya que, gracias al receptor NGF p75 acoplado al extremo amino, se pudo marcar específicamente el transportador localizado en membrana plasmática. Esta propiedad, a su vez, permitió

poner de manifiesto de manera directa la existencia de un proceso de reciclaje del transportador GLT1 internalizado a membrana plasmática.

Se transfectaron células MDCK con NGFR-GLT1 y se procedió a su marcaje *in vivo* en membrana a 4°C. Como se ha descrito anteriormente, el transportador se internalizó a partir de los 15 minutos de incubación a 37°C y transcurrida media hora, la totalidad de la proteína marcada en membrana se encontraba acumulada intracelularmente. Sin embargo, realizando incubaciones a 37°C más largas (2 y 4 horas) se volvió a detectar proteína localizada a nivel de la membrana plasmática (Figura 30).

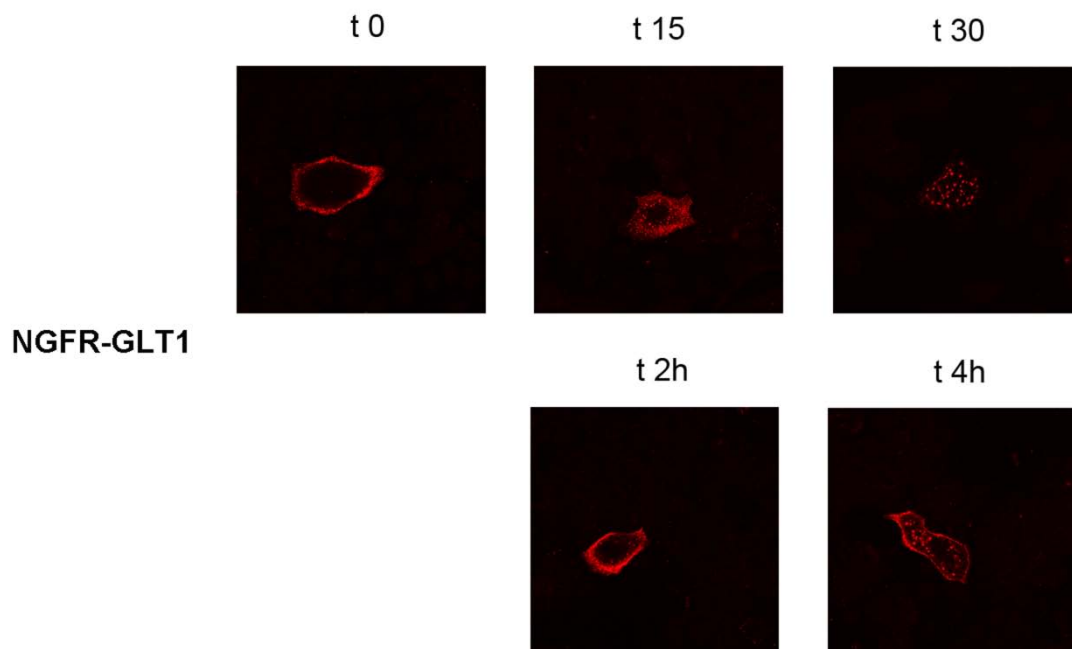


Figura 30. Estudio del reciclaje a membrana plasmática de la quimera NGFR-GLT1 endocitada en condiciones basales.

Células MDCK fueron transfectadas con la quimera NGFR-GLT1 y, transcurridas 48 horas, se realizó su marcaje en membrana plasmática *in vivo* a 4°C con el anticuerpo anti-NGFR y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 555. El transportador se halló localizado en membrana a tiempo 0 (t0). Se realizaron distintas incubaciones a 37°C (15 o 30 minutos y 2 o 4 horas). El estudio del reciclaje a membrana plasmática se llevó a cabo por análisis de las distintas inmunofluorescencias en microscopía confocal.

Este resultado significó que NGFR-GLT1, previamente marcado en membrana plasmática, y que había sido endocitado constitutivamente, al restablecer el tráfico intracelular en incubaciones más largas, volvía a membrana desde compartimentos intracelulares, es decir, se había obtenido una evidencia directa de que el transportador de glutamato GLT1 estaba sujeto a un proceso de reciclaje.

IV.6.2. El tratamiento con leupeptina evidencia que la acumulación de GLT1 intracelular es consecuencia del bloqueo del proceso de reciclaje a membrana plasmática.

La monensina, como ya se ha mencionado anteriormente, debido al efecto que ejerce sobre el gradiente de protones, impide que las proteínas internalizadas pasen a degradación lisosomal o bien se reciclen a membrana plasmática, como se esquematiza en la Figura 12A. La acumulación de GLT1 puesta de manifiesto por este agente ionóforo evidenció un proceso de endocitosis constitutiva y el marcaje con Rab GTPasas indicó una localización del transportador en endosomas tempranos de reciclaje rápido (colocalización con Rab4, Figura 19B). Otro abordaje que ratificó la existencia de un reciclaje de GLT1 a membrana plasmática fue el contrastar estos resultados con los obtenidos tras el tratamiento con leupeptina que se exponen a continuación:

La leupeptina es un inhibidor específico de las proteasas lisosomales por lo que impide la degradación de las proteínas internalizadas. Células MCDK transfectadas con HA-GLT1 fueron tratadas con este compuesto (100 μ g/ml a 37°C) durante 15 minutos, 30 minutos o una hora. Los resultados obtenidos mediante este tratamiento se compararon con los derivados del tratamiento con monensina (35 μ M a 37°C) a los mismos tiempos (Figura 31).

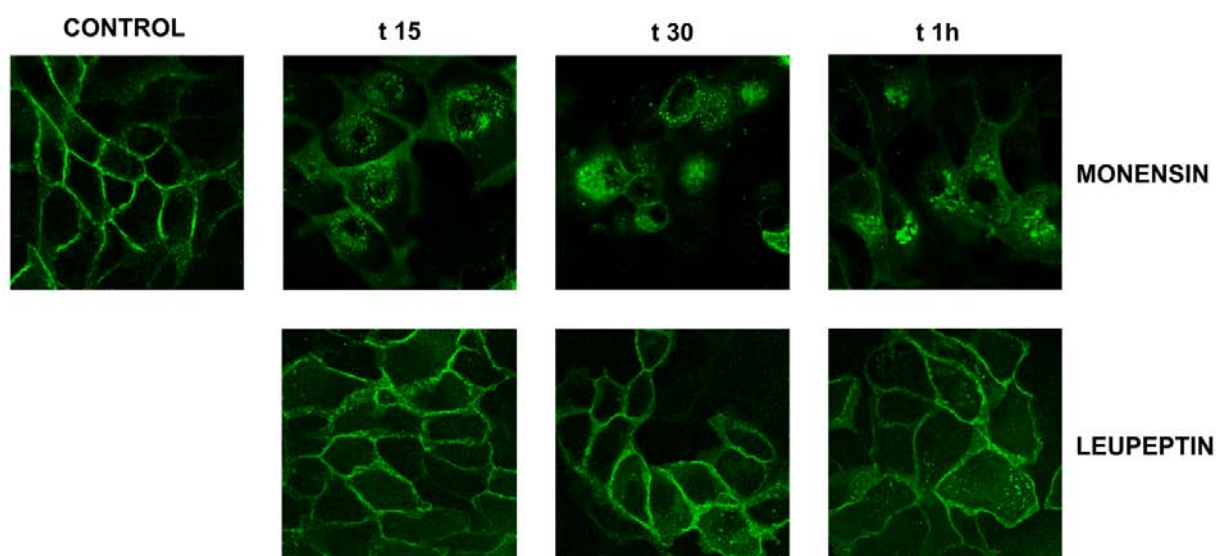


Figura 31. Estudio comparativo del efecto de los tratamientos con monensina y con leupeptina sobre el transportador HA-GLT1.

Células MDCK transfectadas con la construcción HA-GLT1, a las 48 horas, fueron tratadas con el agente ionóforo monensina ($35 \mu\text{M}$ a 37°C) o con el inhibidor de las proteasas lisosomales leupeptina ($100 \mu\text{g/ml}$ a 37°C) durante 15, 30 minutos o 1 hora. Las diferencias entre ambos tratamientos fueron analizadas por microscopia confocal.

Como puede observarse en la figura 31, el tratamiento con monensina produjo la acumulación intracelular de transportador GLT1 a partir de los 15 minutos. La leupeptina, en cambio, no causó ningún efecto sobre la distribución de GLT1 más que a partir de una hora de tratamiento, cuando se comenzó a observar algunas vesículas intracelulares, pero a niveles muy inferiores que la monensina. Dado que la acumulación de transportador intracelular producida por el tratamiento con la monensina se debe tanto al bloqueo de la degradación lisosomal como del reciclaje mientras que la producida por el tratamiento con leupeptina sólo a la inhibición de la degradación lisosomal, las diferencias observadas entre ambos tratamientos deberían corresponder a la proteína reciclada. Por lo tanto, este experimento sugiere que la práctica totalidad del transportador GLT1 acumulado intracelularmente tras el tratamiento con monensina fue consecuencia de la imposibilidad de retornar a membrana plasmática y no de que se estuviese inhibiendo su degradación lisosomal.

En definitiva, tanto los resultados obtenidos mediante la coexpresión de GLT1 con Rab GTPasas como los que se acaban de exponer, demostraron de manera inequívoca la existencia de un reciclaje a membrana plasmática del transportador de glutamato GLT1 endocitado constitutivamente. Este reciclaje representaría otra etapa dentro de lo que se ha denominado tráfico intracelular basal de GLT1.

IV.7. El reciclaje de GLT1 endocitado constitutivamente a membrana plasmática es dependiente del proceso de desubiquitinación.

Una vez demostrada la existencia de un proceso de endocitosis constitutiva dependiente de la ubiquitinación de GLT1 y de su reciclaje a membrana plasmática desde compartimentos endosomales, resultó necesario determinar el posible papel de la desubiquitinación en este proceso.

Como ya se ha mencionado en el apartado de Introducción, la ubiquitinación es una modificación postraducciona reversible de las proteínas gracias a la acción de las desubiquitininasas o enzimas desubiquitinantes. Estas enzimas realizan una actividad opuesta a la de las ubiquitin ligasas (E3) y están involucradas en la regulación del tráfico intracelular y de la estabilidad de muchas proteínas de membrana (McCullough et al., 2004; Ruffieux-Daidié et al., 2008).

El transportador de glutamato GLT1, tratándose de una proteína que ejerce su función en membrana plasmática, y cuyo tráfico intracelular está regulado por ubiquitinación, resultó ser un buen candidato de regulación por desubiquitinación. Esta hipótesis se verificó gracias a la inhibición específica de determinadas desubiquitininasas.

IV.7.1 La inhibición de la desubiquitinasa UCH L1 en células MDCK promueve el paso de GLT1 a degradación lisosomal.

Existen dos desubiquitininasas, UCH L1 y UCH L3, abundantes en el sistema nervioso para las cuales se dispone de inhibidores específicos. Estas enzimas desubiquitinantes pertenecen a la familia de cistein-proteasas ubiquitin proteasas C-terminal (UCHs).

Células MDCK transfectadas con HA-GLT1 fueron tratadas con los inhibidores específicos de estas dos desubiquitininasas (10 μ M a 37°C) a distintos tiempos (2, 4 y 6 horas). El efecto de la inhibición de estas enzimas sobre el transportador GLT1 se

determinó tanto por inmunotransferencia (Figura 32A) como por inmunofluorescencia (Figura 32B).

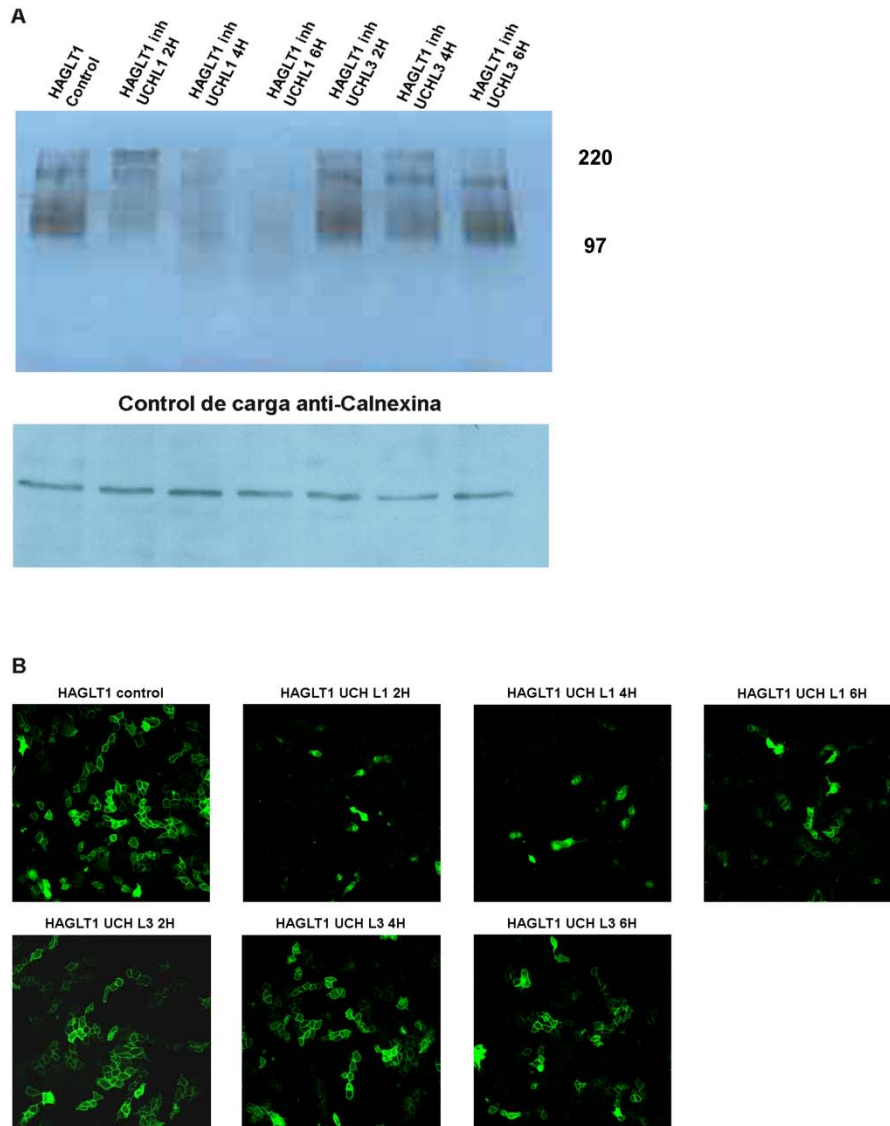


Figura 32. Estudio del efecto de la inhibición de las desubiquitininas UCH L1 y UCH L3 sobre el transportador HA-GLT1 expresado en células MDCK.

Células MDCK fueron transfectadas con la construcción HA-GLT1 y, tras 48 horas, se trataron con los inhibidores específicos de las desubiquitininas UCH L1 (LDN) y UCH L3 ($10\mu\text{M}$ a 37°C) durante 2, 4 o 6 horas. El estudio del efecto de estos inhibidores sobre el transportador GLT1 se analizó tanto por inmunotransferencia (A) como por inmunofluorescencia (B). Las diferencias observadas en los niveles de HA-GLT1 no fueron debidas a diferencias en la expresión, ya que se observaron niveles idénticos de calnexina, chaperona ubicua del retículo endoplásmico, tomada como control de carga. Las imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia se hicieron a menor aumento (25X) para abarcar un mayor número de células en cada imagen y así poner de manifiesto, de manera más evidente, el efecto de la inhibición de estas desubiquitininas sobre HA-GLT1. Se observó como la inhibición a tiempos largos de la desubiquitinasa UCH L1 producía una degradación específica del neurotransportador. La inhibición de la desubiquitinasa UCH L3 no produjo ningún efecto sobre el transportador GLT1.

La inhibición de la desubiquitinasa UCH L1 produjo una degradación del transportador GLT1 a partir de las dos horas de tratamiento y que fue en aumento transcurridas 4 y 6 horas. Este efecto fue claramente visible en *western blot* así como en inmunofluorescencia. La inhibición de UCH L3 no afectó en absoluto a la cantidad de transportador expresado en células MDCK. Como puede observarse en la figura 32A, la disminución en la cantidad de GLT1 producida por la inhibición de UCH L1 fue un efecto específico sobre el transportador ya que en todos los casos se observaron los mismos niveles de calnexina, una chaperona ubicua del retículo endoplásmico tomada como control de carga.

Este resultado sugirió, por lo tanto, que la desubiquitinasa UCH L1 estaba interviniendo, en células MDCK, en el tráfico intracelular basal de GLT1. El papel de esta enzima desubiquitinante sería el de eliminar la ubiquitina unida al transportador endocitado de manera constitutiva y, consecuentemente permitir el proceso de reciclaje de GLT1 a membrana plasmática. El bloqueo de su actividad conduciría al transportador GLT1 ubiquitinado hacia degradación en los lisosomas. La desubiquitinasa UCH L3 no pareció intervenir en absoluto en la regulación del tráfico intracelular basal del neurotransportador.

IV.7.2 La inhibición de la desubiquitinasa UCH L1 pone de manifiesto la endocitosis constitutiva de GLT1 dependiente de ubiquitinación.

Una vez demostrada la intervención de UCH L1 en el tráfico basal de GLT1, fue necesario estudiar su efecto más a corto plazo y en relación con el proceso de ubiquitinación del transportador. Para ello se transfectaron células MDCK con las construcciones HA-GLT1 y HA-GLT1 7KR y se trataron estas células con el inhibidor específico de UCH L1 (LDN) (10 μ M a 37°C) esta vez durante 30 minutos (Figura 33).

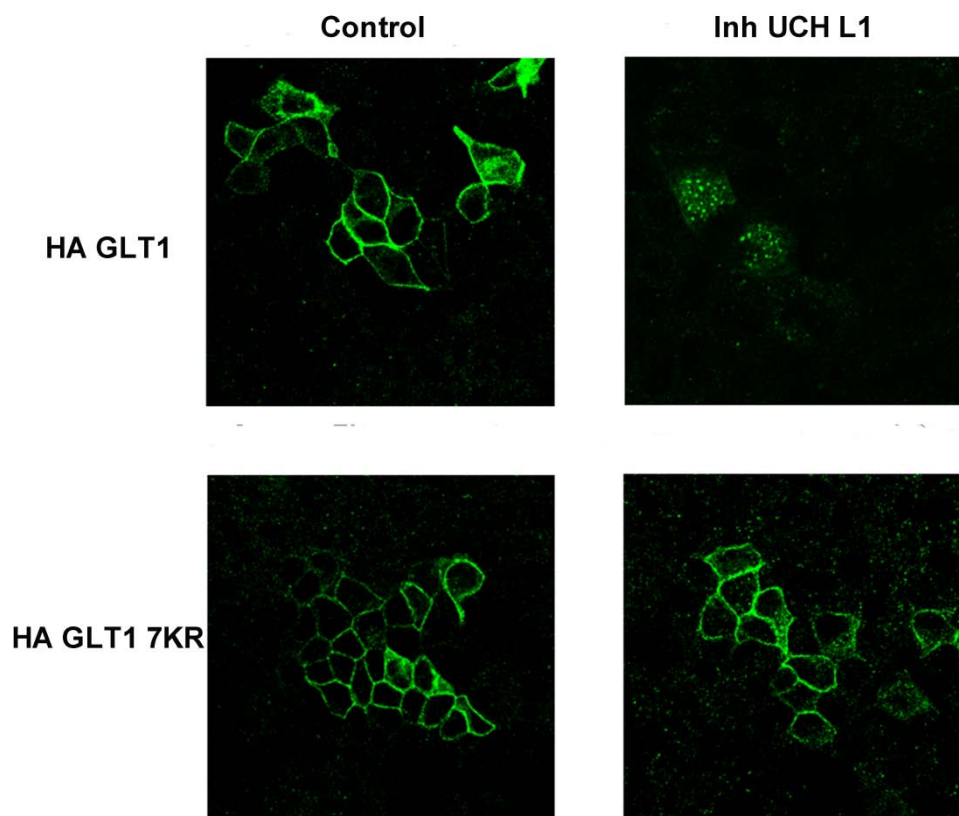


Figura 33. Inhibición de la actividad desubiquitinante de UCH L1 y endocitosis constitutiva de HA-GLT1 y HA-GLT1 7KR.

Células MDCK fueron transfectadas con las construcciones HA-GLT1 y HA-GLT1 7KR y, transcurridas 48 horas, se trataron con el inhibidor específico de la desubiquitinasa UCH L1 (LDN) ($10 \mu\text{M}$ a 37°C) durante 30 minutos. El efecto de esta inhibición sobre el transportador nativo y el mutante 7KR, carente de los siete residuos de lisina del extremo carboxilo, se visualizó en microscopio de fluorescencia.

De forma equivalente al tratamiento con el agente ionóforo monensina, la inhibición de la desubiquitinasa UCH L1 puso de manifiesto el proceso de endocitosis constitutiva del transportador GLT1 nativo ya que, tras 30 min de tratamiento se observó una acumulación de neurotransportador intracelular. En el caso del mutante HA-GLT1 7KR no se observó esta internalización desde membrana plasmática.

Estos resultados indicaron que la inhibición de la actividad desubiquitinante de UCH L1 es otro abordaje, en células MDCK, que permite poner de manifiesto la existencia de un proceso de endocitosis constitutiva del transportador GLT1 dependiente de la ubiquitinación de sus residuos de lisina del extremo carboxilo terminal al igual que en experimentos llevados a cabo en la presencia de monensina. En

efecto, en relación a los resultados expuestos con anterioridad obtenidos mediante tratamientos más largos, a la media hora de inhibición de UCH L1 se visualizó la misma acumulación de transportador producida por la monensina. Si esta inhibición persistía y por lo tanto GLT1 endocitado constitutivamente permanecía ubiquitinado, no podía efectuarse su reciclaje a membrana plasmática y consiguientemente pasaba a compartimentos endosomales posteriores para acabar degradándose en los lisosomas.

IV.7.3. El efecto de la desubiquitinasa UCH L1 es específico del tráfico intracelular basal del transportador de glutamato GLT1.

Ya se ha mencionado con anterioridad la existencia de un tráfico intracelular basal para otros neurotransportadores así como su dependencia del proceso de ubiquitinación. Este es el caso del transportador de glicina GLYT1 (Fernández-Sanchez et al., 2009).

Para determinar si el efecto de UCH L1 sobre el reciclaje de GLT1 a membrana plasmática era específico del transportador de glutamato, al menos en células MDCK, se recurrió al transportador de glicina GLYT1 como control. En efecto, se transfectaron células MDCK con estos dos neurotransportadores acoplados a epítipo fluorescente YFP y se trataron con el inhibidor específico de la desubiquitinasa UCH L1 (LDN) (10 μ M 30 minutos a 37°C). Por otra parte, se empleó el inhibidor de la desubiquitinasa UCH L3 (10 μ M 30 minutos a 37°C) para determinar su posible intervención en el tráfico basal del transportador de glicina GLYT1. Los resultados hallados se muestran en la Figura 34:

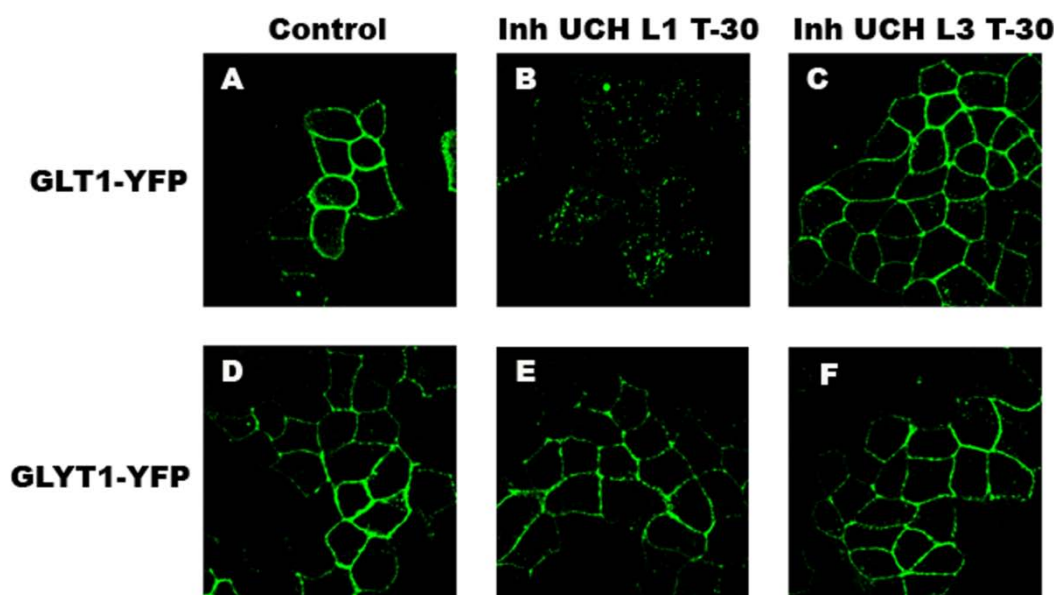


Figura 34. Estudio comparativo del efecto de la inhibición de las desubiquitininas UCH L1 y UCH L3 en el transportador de glutamato GLT1 y el de glicina GLYT1.

Células MDCK fueron transfectadas con las construcciones YFP-GLT1 y YFP-GLYT1. Transcurridas 48 horas, se trataron estas células con los inhibidores específicos de UCH L1 (LDN) y UCH L3 (10 μ M, 30 minutos a 37°C). Ambos neurotransportadores mostraron una distribución homogénea en membrana plasmática en situación control (A y D). Las diferencias observadas entre las distintas desubiquitininas, UCH L1 (B y E) y UCH L3 (C y F), para los dos neurotransportadores fueron analizadas por microscopia confocal gracias al fluoróforo YFP (*Yellow Fluorescent Protein*).

Como puede observarse en los paneles A y D de la Figura 34, ambos neurotransportadores mostraron, en condiciones control, una localización idéntica en membrana plasmática de células MDCK. La inhibición de la desubiquitinasa UCH L1 tuvo un efecto muy distinto en el transportador GLYT1. Mientras que YFP-GLT1 se acumulaba intracelularmente tras 30 min de tratamiento, YFP-GLYT1 permaneció estable en membrana plasmática (paneles B y E). La inhibición de UCH L3, por su parte, no tuvo ningún efecto sobre la localización de ninguno de los dos transportadores (paneles C y F).

Este resultado demostró claramente como el papel que la desubiquitinasa UCH L1 desarrolla en el tráfico intracelular basal de GLT1 es específico para este transportador y no interviene en el tráfico basal del transportador de glicina GLYT1. La

desubiquitinasa UCH L3 por su parte, tampoco mostró indicio alguno de intervenir en la regulación del tráfico intracelular de GLYT1.

IV.7.4. El tratamiento de 30 minutos con el inhibidor de UCH L1 que puso de manifiesto la endocitosis constitutiva de GLT1 nativo corresponde al momento en que el transportador intracelular se halla más ubiquitinado.

Nuestros resultados muestran que la desubiquitinasa UCH L1 interviene específicamente en el tráfico intracelular basal de GLT1 promoviendo su reciclaje a membrana plasmática tras haber eliminado el marcaje por ubiquitinación. El siguiente paso en nuestro estudio fue estudiar directamente dicho marcaje por ubiquitinación en el transportador nativo, así como en el mutante GLT1 7KR localizados en el interior celular. Para ello se planteó el siguiente abordaje:

Como ya se mencionado anteriormente, un método para marcar y cuantificar las proteínas situadas en la superficie celular consiste en la unión de estas mismas al reactivo sulfo-NHS-SS-biotina y su posterior precipitación con estreptavidina agarosa. De manera indirecta, si se toma el sobrenadante tras la incubación con estreptavidina agarosa, se obtendrán las proteínas no unidas a biotina, es decir, aquellas situadas en el interior celular. De esta manera se pudo estudiar la ubiquitinación de GLT1 endocitado constitutivamente.

Este estudio se llevó a cabo en células C6 derivadas de glioma de rata. Se transfectaron estas células con las construcciones HA-GLT1 y HA-GLT1 7KR, tras lo cual se procedió a los distintos tratamientos y posteriormente al marcaje con biotina de las proteínas situadas en la superficie celular. Una vez precipitadas con estreptavidina agarosa, se tomó el sobrenadante correspondiente a las proteínas intracelulares el cual se incubó con un anticuerpo dirigido específicamente frente al epítipo HA y se procedió a su inmunoprecipitación mediante el uso de proteína A sefarosa. Finalmente, el inmunoprecipitado se analizó por inmunotransferencia visualizándose con un anticuerpo dirigido específicamente contra el polipeptido ubiquitina. De esta manera se determinó directamente el marcaje por ubiquitinación del transportador únicamente localizado intracelularmente (Figura 35).

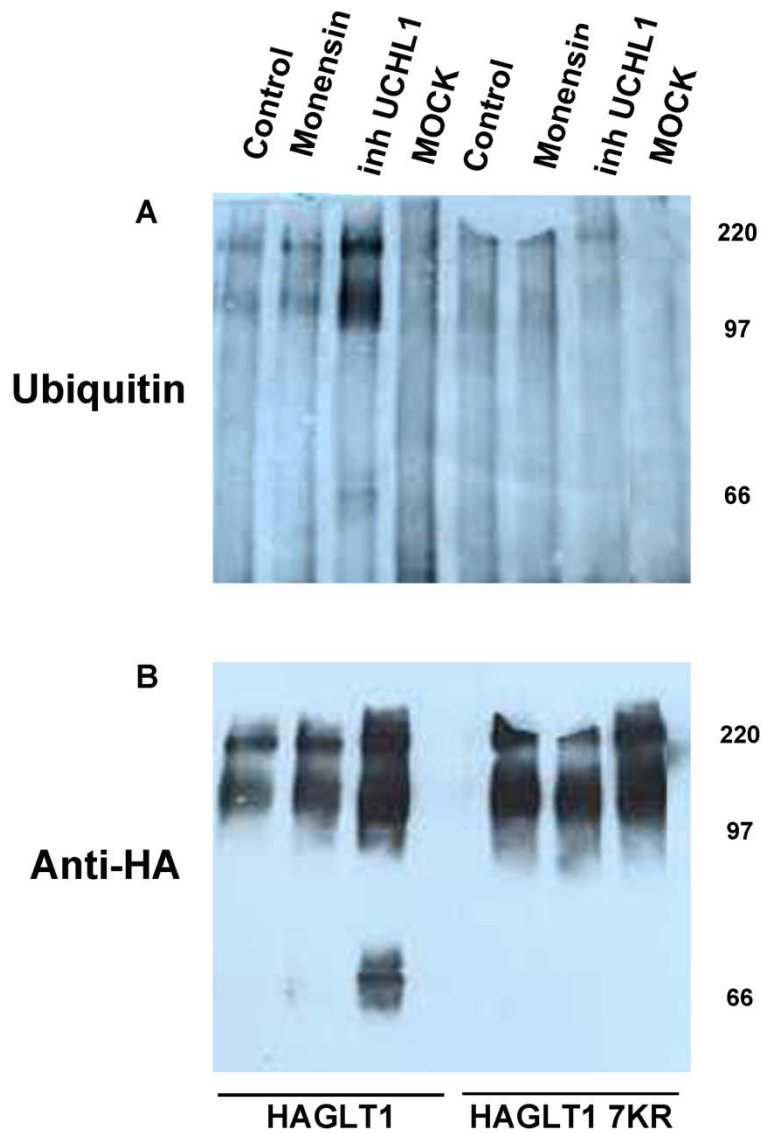


Figura 35. Análisis de la ubiquitinación de HA-GLT1 retenido intracelularmente en células C6.

Células C6 fueron transfectadas con las construcciones HA-GLT1 y HA-GLT1 7KR. A las 48 horas, se procedió al tratamiento con el agente ionóforo monensina (35 μ M, 30 minutos a 37°C) o con el inhibidor específico de la desubiquitinasa UCH L1(LDN) (10 μ M, 30 minutos a 37°C). Se marcaron las proteínas situadas en la superficie celular por unión con sulfo-NHS-SS-biotina y tras su precipitación con estreptavidina agarosa se tomaron las proteínas intracelulares en el sobrenadante. El sobrenadante se incubó con un anticuerpo dirigido frente al epitopo HA y se inmunoprecipitó por unión con proteína A sefarosa. El inmunoprecipitado se reveló en *western blot* con un anticuerpo dirigido específicamente contra el polipeptido ubiquitina. **A:** Se pudo observar como el transportador GLT1 nativo localizado intracelularmente se hallaba más ubiquitinado en el caso del tratamiento con el inhibidor de la UCH L1. No se observaron diferencias en la ubiquitinación entre el caso control y el tratamiento con monensina. En el caso del mutante GLT1 7KR intracelular, se observó un nivel menor de ubiquitinación y no hubo diferencias entre tratamientos y el caso control. **B:** Los resultados observados en los distintos niveles de ubiquitinación no se debieron a distintos niveles de neurotransportador ya que se detectaron niveles muy similares de HA-GLT1 y HA-GLT1 7KR en el reprobado anti-HA.

Los resultados que se incluyen en la figura 35A, demuestran que el transportador nativo se halló más ubiquitinado tras el tratamiento de 30 minutos con el inhibidor de la desubiquitinasa UCH L1 (LDN) (10 μ M a 37°C), momento en el cual, como se ha visto anteriormente (Figura 33), se visualizó claramente la acumulación de GLT1 intracelular. En el caso del tratamiento con monensina la ubiquitinación no presentó diferencias significativas con el caso control. Esto seguramente sea debido a que se trata de una ubiquitinación basal y tan sólo actuando directamente sobre este marcaje (inhibiendo la desubiquitinación) sea posible apreciar diferencias claras. En el caso del mutante GLT1 7KR se pudo observar una ubiquitinación menos evidente del transportador y, sobretodo, no se vio efecto alguno de los tratamientos, en especial de la inhibición de UCH L1 sobre dicho marcaje. Este resultado corrobora lo hallado en inmunofluorescencia de células MDCK, donde no se observó acumulación intracelular de GLT1 7KR tras la inhibición de esta desubiquitinasa. Las diferencias observadas en la ubiquitinación de HA-GLT1 y HA-GLT1 7KR no fueron debidas a diferencias en la expresión de estas proteínas ya que se detectaron, en todos los casos, niveles muy similares de transportador en un reprobadado anti-HA (Figura 35B).

Este abordaje permitió poner directamente de manifiesto la actividad de la desubiquitinasa UCH L1 sobre el transportador GLT1 nativo endocitado constitutivamente ya que su inhibición produjo un acumulación intracelular de transportador ubiquitinado. El mutante GLT1 7KR por su parte, al carecer de los residuos de lisina involucrados en el proceso de endocitosis constitutiva dependiente de ubiquitinación no se vio afectado por esta actividad desubiquitinante.

En definitiva, el transportador de glutamato GLT1 endocitado constitutivamente desde membrana plasmática a compartimentos endosomales tempranos está sujeto a un proceso de reciclaje dependiente de la desubiquitinación del transportador. La desubiquitinasa UCH L1 es la encargada de llevar a cabo esta tarea y regula por lo tanto, en células MDCK y en un sistema de expresión más cercano al fisiológico, como son las células C6, el retorno de GLT1 a membrana plasmática.

IV.8. El reciclaje del transportador GLT1 a membrana plasmática está regulado por los niveles de calcio intracelular.

Finalmente, una vez demostrada la intervención de la desubiquitinación como requisito fundamental para que el transportador GLT1 endocitado constitutivamente regrese a membrana plasmática, se decidió estudiar la posible intervención de otro agente regulador en el proceso de reciclaje, pero ya a un nivel más próximo a la inclusión de las vesículas de reciclaje a membrana plasmática; el calcio intracelular.

El calcio intracelular representa uno de los mensajeros intracelulares más importantes e interviene en la fusión de membranas intracelulares y en el proceso de exocitosis de las vesículas sinápticas portadoras de neurotransmisor y vesículas exocíticas en astrocitos (Rizo y Rosenmund, 2008; Kreft et al., 2009).

En este estudio se analizó su papel en el tráfico intracelular del transportador de glutamato GLT1 recurriendo al agente quelante de calcio BAPTA/AM.

IV.8.1. El tratamiento con el agente quelante de calcio intracelular BAPTA/AM produce una acumulación intracelular de transportador GLT1.

Hasta el momento, se ha puesto de manifiesto el proceso de endocitosis constitutiva de GLT1 por el bloqueo del transporte intracelular producido por el agente ionóforo monensina y por la inhibición de la actividad desubiquitinante de la enzima UCH L1. En ambos caso este proceso se manifestó como una acumulación de GLT1 intracelular.

El tratamiento con el agente quelante de calcio intracelular BAPTA/AM (30 μ M 30 minutos a 37°C) en células MDCK produjo la misma acumulación intracelular de HA-GLT1 (Figura 36)

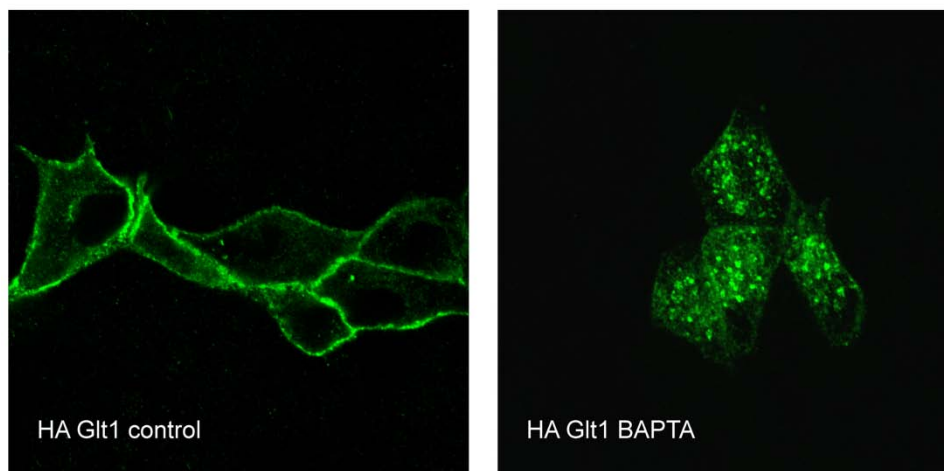


Figura 36. Calcio intracelular y endocitosis constitutiva de HA-GLT1.

Células MDCK fueron transfectadas con HA-GLT1 y tras 48 horas fueron tratadas con el agente quelante de calcio intracelular BAPTA/AM (30 μ M, 30 minutos a 37°C). El efecto de la retirada de este catión del citoplasma se analizó por observación de las distintas inmunofluorescencias en microscopía confocal.

El papel del calcio en el tráfico basal intracelular de GLT1 sería el de regular la fusión de las vesículas de reciclaje a membrana plasmática y, por lo tanto, al retirar este catión del citoplasma con el agente quelante, la acumulación observada de transportador GLT1 retenido correspondería a vesículas de reciclaje rápido incapaces de fusionarse con la membrana plasmática. El efecto calcio intracelular, al ser un regulador del tráfico basal de GLT1, debería verse afectado por el proceso de ubiquitinación del transportador.

IV.8.2. La internalización del transportador puesta de manifiesto por la retirada del calcio intracelular es dependiente de la ubiquitinación de GLT1 siendo el residuo más importante la lisina 526.

Para evidenciar el papel de la ubiquitinación en la internalización constitutiva de GLT1 tras el tratamiento con BAPTA/AM, se volvió a recurrir a los distintos mutantes de los siete residuos de lisina del extremo carboxilo del transportador.

En primer lugar, se transfectaron células MDCK con HA GLT1 nativo, con HA-GLT1 7KR y con los distintos mutantes de reintroducción progresiva (Figura 37).

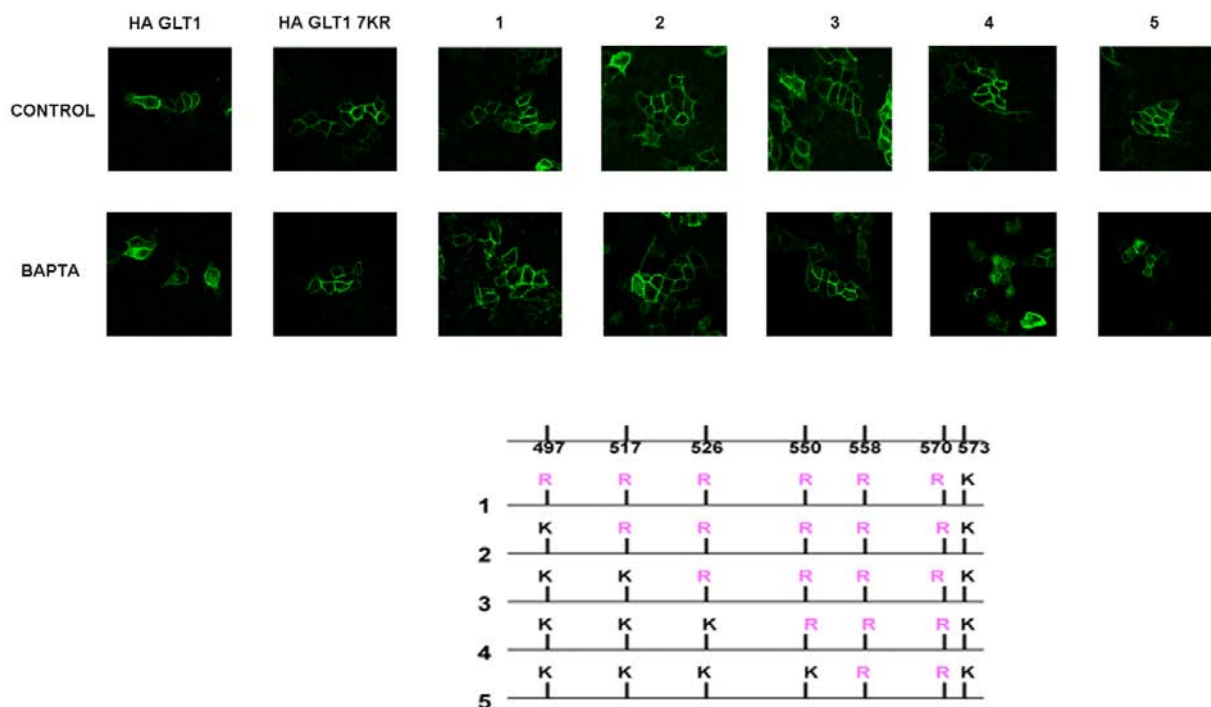


Figura 37. Estudio del efecto del agente quelante de calcio intracelular BAPTA/AM sobre los mutantes de reintroducción progresiva.

Células MDCK fueron transfectadas con HA-GLT1, HA-GLT1 7KR y con los distintos mutantes de reintroducción progresiva en los que, a partir del mutante HA-GLT1 7KR, se fueron reintroduciendo una a una las lisinas del extremo carboxilo del transportador GLT1. Transcurridas 48 horas, se procedió al tratamiento con BAPTA/AM (30 μ M, 30 minutos a 37°C). Los efectos sobre la proteína nativa así como sobre los distintos mutantes fueron analizados por microscopía confocal.

En el caso control, todas las construcciones se localizaron homogéneamente distribuidas en la membrana plasmática de las células MDCK. Tras el tratamiento con el agente quelante de calcio intracelular BAPTA/AM (30 μ M 30 minutos a 37°C) se observó una acumulación de GLT1 nativo endocitado constitutivamente. El mutante GLT1 7KR permaneció localizado en membrana tras el tratamiento al igual que los mutantes de reintroducción progresiva hasta la reintroducción del residuo de lisina 526 (caso 4), donde se pudo apreciar claramente una acumulación intracelular de GLT1 similar a la del transportador nativo.

Al igual que en la endocitosis puesta en evidencia por el agente ionóforo monensina, con el fin de determinar con mayor exactitud la dependencia de la ubiquitinación de las lisinas del extremo carboxilo del transportador GLT1, se recurrió a los mutantes de reintroducción única en los que se restablecía solamente un residuo de lisina sobre el mutante GLT1 7KR. Estas construcciones se expresaron en células MDCK (Figura 38).

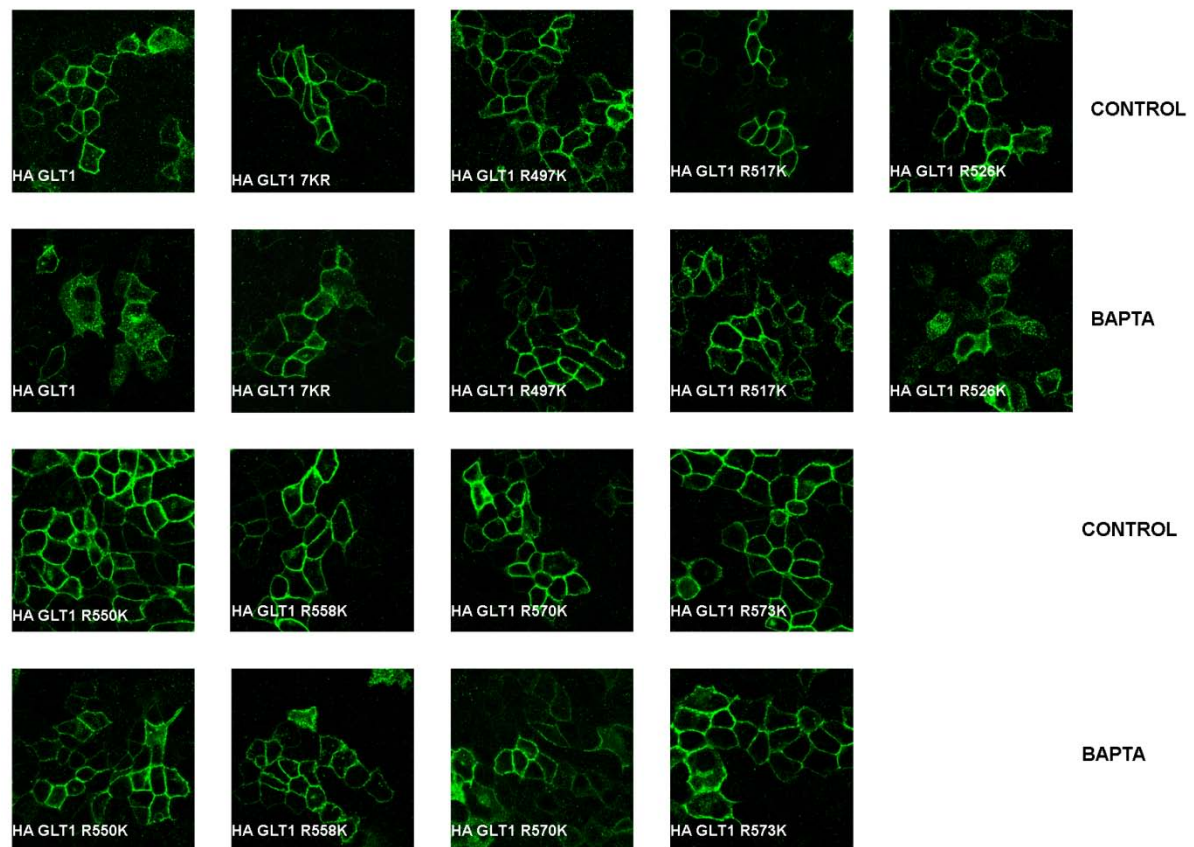


Figura 38. Estudio del efecto del agente quelante de calcio intracelular BAPTA/AM sobre los mutantes de reintroducción única.

A partir del mutante HA-GLT1 7KR se generaron los siete mutantes de reintroducción única en los que se reintrodujeron solamente un residuo de lisina en cada construcción. Todos ellos, al igual que HA-GLT1 nativo y el mutante HA-GLT1 7KR, se expresaron en células MDCK. Dos días después de la transfección se procedió al tratamiento con BAPTA/AM (30 μ M, 30 minutos 37°C). Los efectos producidos por la retirada del calcio intracelular se observaron y analizaron por microscopía confocal.

El transportador GLT1 nativo, tras la retirada del calcio intracelular con BAPTA/AM (30 μ M 30 minutos a 37°C) se acumuló en compartimentos intracelulares. El mutante GLT1 7KR y todos los mutantes de reintroducción única, a excepción de HA-GLT1 R526K, permanecieron estables en la membrana plasmática tras el

tratamiento con el agente quelante de calcio. Así pues, mientras que en la endocitosis evidenciada por monensina o por esteres de forbol las lisinas relevantes fueron las 517 y 526, en el caso de la internalización por BAPTA/AM solo parece intervenir el residuo 526.

En definitiva, los resultados aquí expuestos demuestran que el transportador de glutamato GLT1 está sujeto a un proceso de endocitosis constitutiva dependiente de la ubiquitinación del transportador en su extremo carboxilo, en especial de los residuos 517 y 526. Dicha endocitosis se realiza principalmente por la vía dependiente de clatrina no pudiendo excluir otras posibilidades incluso independientes de la ubiquitinación del transportador. Esta internalización constituiría la primera etapa del tráfico intracelular basal de GLT1. Una vez internalizado, GLT1 retenido en endosomas tempranos se recicla a membrana plasmática para lo cual ha de ser desubiquitinado, proceso en el cual interviene de manera específica la desubiquitinasa UCH L1. El transportador que permanece ubiquitinado pasa a compartimentos endosomales posteriores para acabar degradándose en los lisosomas. Las vesículas de reciclaje rápido se fusionan con la membrana plasmática volviendo así a incorporar transportador funcional y por lo tanto capaz de retirar glutamato del espacio extracelular. Este último paso parece requerir la presencia de calcio intracelular como agente regulador.

IV.9. Estudio de las interacciones del transportador GLT1 nativo en membrana plasmática en cerebro.

Con el objetivo de identificar proteínas que pudieran intervenir en el tráfico de GLT1 se planteó un estudio proteómico que permitiera aislar aquellas proteínas que coinmunoprecipitaran con GLT1 en solubilizados de cerebro de rata. Para ello, se aisló la fracción enriquecida en membranas celulares (fracción P2) y tras su solubilización con dimetil-maltosido se procedió a la inmunoprecipitación con dos anticuerpos dirigidos frente a GLT1. La eficacia en inmunoprecipitación de estos anticuerpos fue compraba mediante *western blot* (Figura 39A). Tras la separación de las proteínas del inmunoprecipitado por su masa molecular en un gel en gradiente (4-10%), se procedió al análisis proteómico de los péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina de las bandas 1 y 2 (Figura 39B).

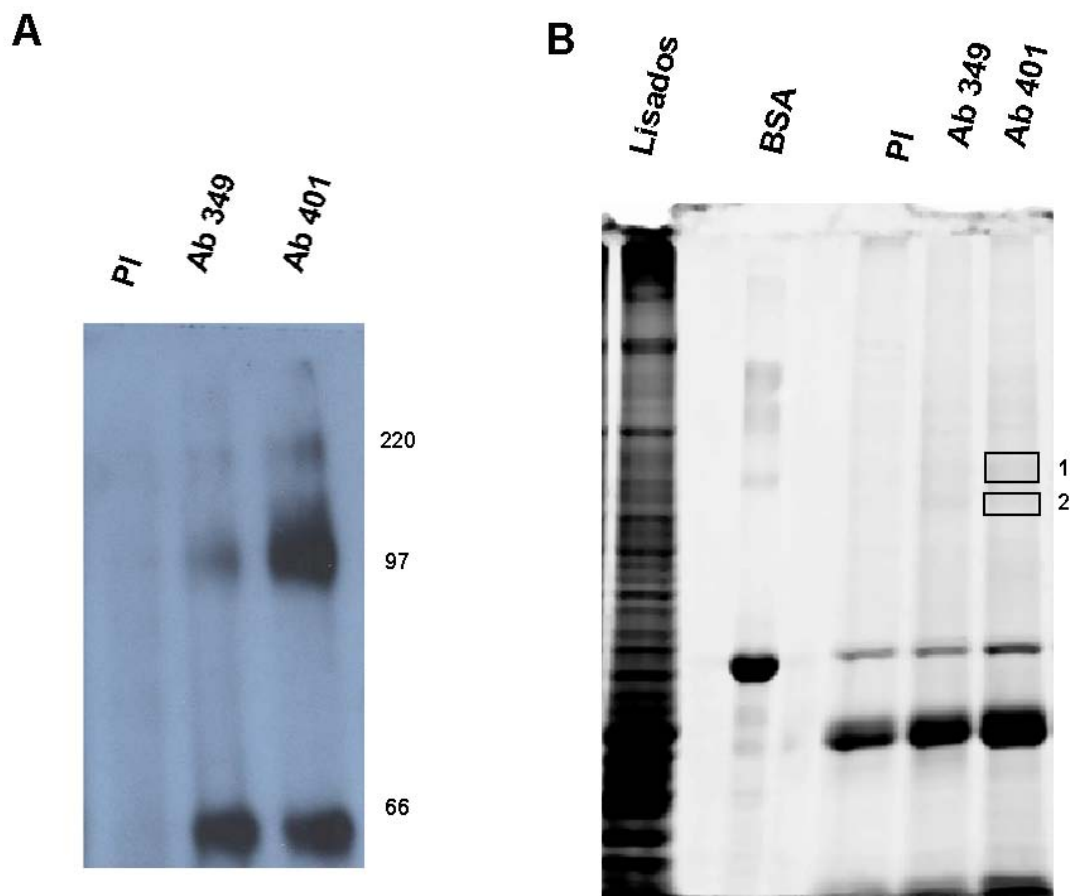


Figura 39. Estudio de las interacciones de GLT1 en solubilizados de cerebro de rata.

Se extrajo el cerebro a ratas wistar de tres meses y se aisló la fracción enriquecida en membranas celulares (fracción P2) como se indica en el apartado Materiales y Métodos. Las proteínas se solubilizaron con dimetil-maltosido y fueron incubadas con dos anticuerpos dirigidos específicamente contra GLT1 (Ab 349 y Ab 401). **A.** La eficiencia en inmunoprecipitación de estos anticuerpos se comprobó en *western blot*. **B.** Las proteínas del inmunoprecipitado se separaron por su masa molecular en gel de poliacrilamida en gradiente (4-10%). Este gel se fijó en metanol- acético y se procedió a su tinción con SYPRO Ruby. Las bandas 1 y 2 se recortaron y fueron digeridas con tripsina para realizar el análisis proteómico de los péptidos obtenidos.

Tras la identificación de los péptidos obtenidos, se obtuvieron evidencias de que el transportador GLT1 coimmunoprecipitó con las siguientes proteínas (Valor XCorr significativo):

- Molécula de adhesión celular neural (NCAM): Esta proteína interviene en la adhesión neurona-neurona así como en la fasciculación y extensión de las neuritas.

- Proteína proteolipídica de la mielina: Esta es la principal proteína mielinica del sistema nervioso central. Juega un papel relevante en la formación y conservación de la estructura multilaminar de la mielina.
- Neurofilamentos medianos (M): Los neurofilamentos generalmente constan de tres tipos de proteínas de filamentos intermedios: L (ligeros), M (medianos) y H (pesados). Intervienen en el mantenimiento del calibre neuronal.
- Contactina 1: Las contactinas son proteínas que intervienen en interacciones en superficie celular durante el desarrollo del sistema nervioso. Participan en la unión neurona-glia y actúan como ligando de la proteína NOTCH1.
- Sodio potasio ATPasa: Esta proteína ubicua de membrana es la encargada de generar los gradientes de sodio y potasio. Consta de una subunidad α que contiene dominios de unión a ATP y una subunidad β , altamente glicosilada, necesaria para la actividad enzimática.

Estos resultados indican, por lo tanto, que el transportador GLT1 interacciona directa o indirectamente en membrana plasmática con estas proteínas en el sistema nervioso.

V. DISCUSIÓN

El glutamato es el neurotransmisor excitador más importante del sistema nervioso central de mamíferos y su liberación a la hendidura sináptica posibilita la transmisión de los impulsos nerviosos que determinan procesos de tanta importancia como la cognición, la memoria y el aprendizaje (Miyamoto, 2006). Sin embargo, una sobreestimulación de los receptores de glutamato de la neurona postsináptica puede conducir a muerte celular por excitotoxicidad. El principal mecanismo por el que se evita esta muerte neuronal es el mantenimiento del glutamato a concentraciones muy finamente reguladas y que se encuentran entre 1 y 5 μM (Rossi et al., 2007). Esto se consigue a través de un mecanismo de recaptación del neurotransmisor de la hendidura sináptica hacia compartimentos presinápticos o bien hacia las células de glía adyacentes, proceso en el que intervienen cinco neurotransportadores de alta afinidad específicos de glutamato pertenecientes a la familia génica *SLC1*, de los cuales el más importante puesto que es responsable de un 90% del transporte de glutamato en el SNC, es EAAT2 o GLT1 (Danbolt, 2001). El transportador GLT1 se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática de los astrocitos desde donde realiza su actividad y una bajada en su expresión está asociada con numerosas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (Rothstein et al. 1995; Trotti et al, 1999), la isquemia (Bruhn et al., 2000), daños cerebrales traumáticos (Rao et al., 1998), la epilepsia (Samuelsson et al., 2000; Ingram et al., 2001) o la enfermedad de Alzheimer (Li et al., 1997).

La actividad de toda proteína de membrana viene determinada por su síntesis *de novo* y su posterior tráfico hacia la membrana y por otra parte, por la endocitosis de aquella proteína localizada en membrana hacia compartimentos intracelulares, ya sea para ser degradada o bien para volver a ser incorporada como proteína funcional, todo ello a través de un tráfico intracelular basal y un proceso de reciclaje a la membrana plasmática. Las sinapsis neuronales son sistemas dinámicos donde los transportadores están sujetos a un tráfico muy activo, capaz de dar respuestas rápidas a cambios en el ambiente celular mediante variaciones de la concentración de transportador en la membrana plasmática (Tzingounis et al., 2007).

La síntesis y expresión del transportador GLT1 están directamente reguladas por los terminales presinápticos mediante interacción célula-célula. En efecto, Yang y colaboradores (2009) demostraron que el contacto entre axones y células de glía circundantes es necesario para inducir la expresión de GLT1. Estos autores observaron un máximo nivel de expresión del transportador GLT1 transcurridas 92 horas en un cultivo mixto de neuronas y astrocitos. Esta regulación se lleva a cabo a través del factor nuclear KBBP (*kappa B-motif binding phosphoprotein*), cuya interacción con el promotor de GLT1 es necesaria para la activación transcripcional del transportador regulada por neuronas (Yang et al., 2009). Estudios previos han determinado que GLT1 permanece estable al menos 24 horas en presencia de inhibidores de la transcripción o de la traducción, lo que indica que este transportador tiene una vida media superior a 24 horas (Zelenaia y Robinson, 2000).

Teniendo en cuenta todos estos datos, el mecanismo por el que más rápidamente se regula GLT1 parece ser el control de su degradación y no su síntesis *de novo*. En efecto, esto ocurre en la bajada de expresión de GLT1 asociada a episodios isquémicos, donde la pérdida de transportador se asocia con una mayor degradación del mismo (Sheldon et al., 2008). La degradación de GLT1 está regulada a su vez, por ejemplo, por la proteína quinasa C (PKC) ya que su activación mediante ésteres de forbol produce una disminución en los niveles de transportador presente en la membrana plasmática y una degradación de GLT1 en los lisosomas (Susarla y Robinson, 2008). Esta quinasa regula la actividad y/o expresión en membrana plasmática de otros muchos neurotransportadores como el de dopamina DAT (Daniels y Amara, 1999; Melikian y Buckley, 1999; Sorkina et al., 2005), un subtipo de transportador de GABA (Corey et

al., 1994; Quick et al., 1997), el transportador de serotonina SERT (Quian et al., 1997; Magnani et al., 2004), el de norepinefrina NET (Apparsundaram et al., 1998; Jayanthi et al., 2004), el transportador de glicina GLYT1 (Gomez et al., 1995; Sato et al., 1995) y otro subtipo de transportador de glutamato, EAAC1 (EAAT3) (Davis et al., 1998; Guillet et al., 2005). En el caso de GLT1, la activación de la PKC induce la internalización y posterior degradación lisosomal del transportador ubiquitinado. El proceso de ubiquitinación regula la endocitosis mediada por clatrina del transportador e involucra a los siete residuos de lisina situados en la región carboxilo terminal de la proteína, en especial los residuos 517 y 526 (Sheldon et al., 2008; González-González et al., 2008).

Pero, al margen de la síntesis *de novo* y de la internalización y degradación regulada, muchas proteínas de membrana plasmática están también sometidas a un tráfico intracelular basal que implica la existencia de un proceso de endocitosis constitutiva acoplado a un reciclaje de vuelta a membrana plasmática. Este tráfico basal añade un tercer nivel de regulación posibilitando así un ajuste más fino de la actividad y expresión de estas proteínas y ha sido descrito en el caso de varios neurotransportadores como el de dopamina DAT (Sorkina et al., 2005; Eriksen et al., 2009; Eriksen et al., 2010), el de glicina GLYT1 (Fernández- Sánchez et al., 2009) o el de glutamato EAAC1 (González et al., 2007). En cada caso, los mecanismos celulares involucrados, así como las proteínas asociadas implicadas en dicho proceso varían, lo que también sugiere una elevada especificidad en este nivel de regulación.

En efecto, en el caso del transportador de glutamato EAAC1, González y colaboradores (2007) obtuvieron evidencias de que su tráfico intracelular basal está regulado por la caveolina-1, ya que el dominante negativo Cav-1 S80E ralentizó tanto el tráfico hacia membrana plasmática como la endocitosis constitutiva del transportador en células C6 derivadas de glioma. Este mismo efecto se observó en cultivos primarios mixtos de neuronas y astrocitos provenientes de ratones *knock-out* de caveolina. Además, demostraron la formación de complejos inmunoprecipitables EAAC1-caveolina. Estos datos concuerdan con la asociación descrita entre EAAC1 y las balsas lipídicas (González et al., 2004). El transportador de dopamina, sin embargo, se endocita constitutivamente por la vía dependiente de clatrina y dinamina, ya que el silenciamiento de estas proteínas mediante el uso de ARN interferentes inhibió la

internalización de DAT (Sorkina et al., 2005). Cabe señalar que si bien la endocitosis de DAT regulada por PKC es dependiente de la ubiquitinación de tres residuos de lisina (Lys¹⁹, Lys²⁷ y Lys³⁵) situados en su región amino terminal (Miranda et al., 2007), su endocitosis constitutiva no parece involucrar a esta modificación postraducciona de las proteínas, ya que la mutación de estos tres residuos no afectó a la internalización del transportador (Eriksen et al., 2010). Por último, el tráfico intracelular basal del transportador de glicina GLYT1, al igual que su endocitosis regulada por PKC, si depende de la ubiquitinación del extremo carboxilo del transportador (Lys⁶¹⁹) y también involucra a la vía de endocitosis dependiente de dinamina y clatrina (Fernández-Sánchez et al., 2009).

En este estudio se ha demostrado la existencia de un tráfico intracelular basal en el caso del transportador de glutamato GLT1, tanto en sistemas heterólogos como las células MDCK y C6, como en cultivos primarios de atrociitos de rata, situación más cercana a la expresión fisiológica del transportador. Este tráfico intracelular basal implica tanto la existencia de un proceso de endocitosis constitutiva desde membrana plasmática hacia compartimentos endosomales, como un reciclaje desde estos compartimentos intracelulares a la superficie celular.

El proceso de endocitosis constitutiva representa la fase inicial del tráfico intracelular basal y supone la existencia de una maquinaria celular en continuo funcionamiento capaz de retirar la proteína de la membrana plasmática sin necesidad de activar ningún agente regulador. La naturaleza misma de este fenómeno condiciona los abordajes experimentales con los que se pone de manifiesto. En efecto, tanto en el caso del transportador GLT1, en este estudio, como para los demás neurotransportadores mencionados anteriormente, los abordajes empleados para evidenciar esta internalización fueron muy similares y se basaron en la capacidad de detener este proceso y de producir una acumulación intracelular visible de transportador. El bloqueo del tráfico intracelular producido por la monensina, al igual que marcaje en membrana plasmática *in vivo* de proteínas quiméricas se utilizó también en el caso del transportador de glicina GLYT1 (Fernández-Sánchez et al., 2009) y el de dopamina DAT (Sorkina et al., 2005; Eriksen et al., 2010). Sin embargo, estos abordajes experimentales, aunque son totalmente válidos, tienen el inconveniente de mostrar tan solo una imagen del proceso estudiado. Existen aproximaciones experimentales más

dinámicas mediante las cuales se puede visualizar el proceso de endocitosis constitutiva en células vivas y por lo tanto en todo su desarrollo y a tiempo real. Actualmente, disponemos de construcciones en las que el transportador GLT1 está acoplado a la proteína fotoconvertible Dendra2 (Hong et al., 2010). Esta proteína, capaz de emitir fluorescencia en dos colores distintos, permite distinguir el transportador situado en membrana plasmática del que se sintetiza *de novo* y se incorpora a membrana posteriormente. De esta forma, es posible realizar estudios en células vivas de la endocitosis constitutiva del transportador así como de su tráfico intracelular en condiciones basales. No cabe duda de que en el futuro esta herramienta podrá aportar más información sobre la internalización y el tráfico basal de GLT1.

Los resultados hallados acerca de la vía de endocitosis que el transportador GLT1 toma en su tráfico intracelular basal indican de manera inequívoca una dependencia de clatrina. Esta vía de endocitosis constituye la vía mayoritaria a través de la cual son endocitadas las proteínas en células eucariotas y su papel en el tráfico intracelular de GLT1 se ha demostrado mediante su inhibición en presencia de sacarosa a concentraciones hipertónicas, que retuvo al transportador en membrana plasmática, tanto tras el tratamiento con monensina, como en el caso de la internalización de la proteína quimérica NGFR-GLT1 en condiciones basales. Además, la colocalización observada del transportador retenido intracelularmente con la GTPasa Rab5 es otro dato que señala claramente la participación de esta vía de endocitosis, ya que esta RabGTPasa, localizada en los endosomas tempranos, participa en la endocitosis y fusión de vesículas recubiertas de clatrina (McLauchlan et al., 1998; Stenmark, 2009).

El transportador GLT1, por lo tanto, está utilizando la misma vía de entrada al interior celular ya sea para ser degradado en los lisosomas tras la activación de la PKC, como para ser internalizado constitutivamente y posteriormente reciclado de vuelta a membrana plasmática en condiciones basales. En el caso del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se ha descrito, sin embargo, como la fracción de la proteína que va a ser reciclada de vuelta a membrana se endocita por la vía dependiente de clatrina mientras que otra fracción, dirigida hacia degradación lisosomal toma una vía independiente de clatrina (Sigismund et al., 2008). La vía de endocitosis asociada a las balsas lipídicas, dominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos, y dependiente de caveolina no parece intervenir en el tráfico basal de GLT1. En efecto, la

depleción del colesterol, necesario para la formación de estos microdominios de membrana, producida por el tratamiento con filipina y metil-beta-ciclodextrina no bloquea la internalización constitutiva del transportador. Sin embargo, se ha descrito una asociación del transportador GLT1 con balsas lipídicas (Butchbach et al., 2004), por lo que parece necesario profundizar en el estudio de una posible dependencia caveolina en el tráfico intracelular basal del transportador. En este punto, puede resultar de gran utilidad el uso de ARNs interferentes específicos de clatrina y caveolina con los que poder silenciar la expresión de cada una de estas proteínas o de ambas simultáneamente y así esclarecer por completo el grado de implicación de cada una en la endocitosis constitutiva del transportador GLT1. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos con estos ARNs que no han aportado aún resultados concluyentes puesto que no hemos conseguido silenciamientos de eficiencia suficiente.

En este estudio se ha demostrado que el reclutamiento de los componentes de la maquinaria endocítica necesarios para la correcta internalización constitutiva del transportador GLT1 se realiza gracias a la ubiquitinación de su extremo carboxilo. En efecto, la ubiquitina añadida a las proteínas de membrana que van a ser internalizadas tendría la capacidad de reclutar a una serie de adaptadores de la vía de endocitosis dependiente de clatrina (Traub et al., 2007; Zhou et al., 2004), aunque se han considerado posibilidades alternativas (Sigismund et al., 2005). El papel de la ubiquitinación en el tráfico intracelular basal de GLT1 se ha demostrado, en células MDCK y en astrocitos tanto inhibiendo la actividad de la enzima E1, necesaria para activar las moléculas de ubiquitina libres, como mediante mutagénesis dirigida de los siete residuos de lisina del extremo carboxilo del transportador. Al igual que en el caso de la internalización regulada por la PKC (González-González et al., 2008), fueron los residuos de lisina 517 y 526 los que mostraron jugar un papel más importante.

Ninguno de estos dos experimentos constituye la prueba definitiva de una ubiquitinación directa del transportador GLT1. Sin embargo, a pesar de tratarse de una ubiquitinación basal si hemos hallado la evidencia de cómo la inhibición de la desubiquitinación, proceso necesario para el reciclaje de GLT1 a membrana plasmática, produce una acumulación intracelular de transportador ubiquitinado detectable en inmunotransferencia mediante un anticuerpo dirigido frente a ubiquitina (Figura 35A de Resultados). Este abordaje fue el mismo que puso de manifiesto la ubiquitinación de

GLT1 tras activación de la PKC (Sheldon et al., 2008; González-González et al., 2008) y ya puede considerarse una evidencia de la ubiquitinación directa del transportador en la regulación de su tráfico intracelular basal.

El transportador GLT1, por lo tanto, requiere de la ubiquitinación de los mismos residuos de lisina, tanto para ser internalizado tras activación de la PKC y posteriormente ser degradado en los lisosomas, como para su internalización constitutiva y tráfico intracelular basal. La especificidad en esta regulación, seguramente venga determinada por diferencias cuantitativas y cualitativas en la ubiquitinación del transportador GLT1, en cada caso. En efecto, la activación de la PKC debería inducir una mayor actividad de la maquinaria de ubiquitinación que en condiciones basales. En este punto resultaría muy útil un análisis cuantitativo de la ubiquitinación de GLT1 mediante espectrometría de masas, ya que revelaría tanto la cantidad de ubiquitina ligada al transportador, como el tipo de ubiquitinación implicado en cada caso (monoubiquitinación, multiubiquitinación o poliubiquitinación). Por otra parte, tratándose en nuestro estudio de una ubiquitinación implicada en la regulación del tráfico intracelular de GLT1 o bien de su degradación lisosomal, es esperable que se trate de cadenas de poliubiquitina unidas a través de Lys⁶³ y no de Lys⁴⁸, cuya función es la de dirigir a las proteínas marcadas hacia degradación en el proteasoma (26S) (Pickart et al., 2004). Estudios similares han determinado, en el caso del receptor EGFR, como monoubiquitina y poliubiquitina pueden ser señales que intervienen en distintos procesos endocíticos y cuya eficacia en el reclutamiento de los componentes necesarios para su internalización puede variar (Huang et al., 2006). Por último, otro aspecto que puede ser determinante en la regulación diferencial del proceso de endocitosis constitutiva de GLT1 con respecto a su endocitosis regulada PKC es la ubiquitin ligasa (E3) implicada en cada caso. En efecto, existen más de 400 ubiquitin ligasas codificadas en el genoma humano (Li et al., 2005), por lo que son las que confieren al proceso de ubiquitinación un alto grado de especificidad. Estudios previos de nuestro laboratorio parecen indicar que la ubiquitin ligasa implicada en la internalización regulada por PKC de GLT1 es Nedd4-2, al igual que ocurre en el caso del transportador de dopamina DAT (Sorkina et al., 2006). Determinar la ubiquitin ligasa que interviene en el proceso de endocitosis constitutiva de GLT1 resulta necesario para comprender como, a través del marcaje por ubiquitinación, se está

confiriendo la especificidad necesaria para distinguir el destino del transportador internalizado constitutivamente del de aquel endocitado tras la activación de la PKC.

Una vez internalizado, el transportador GLT1 ubiquitinado pasa al sistema endosomal y queda retenido en los endosomas tempranos. En un primer paso en aquellos positivos para la GTPasa Rab5, implicados en la endocitosis dependiente de clatrina para posteriormente pasar a endosomas implicados en el reciclaje rápido a membrana plasmática (*'short loop' recycling*) y asociados con la GTPasa Rab4. En el caso del transportador de dopamina sin embargo, Eriksen y colaboradores (2010) observaron que DAT endocitado constitutivamente se acumulaba mayoritariamente en endosomas positivos para la GTPasa Rab7, implicada en la maduración de los endosomas tardíos y en su fusión con los lisosomas (Eriksen et al., 2010; Stenmark, 2009). Estas diferencias en el tráfico intracelular entre GLT1 y DAT se visualizan perfectamente comparando los resultados hallados tras su tratamiento con monensina o con leupeptina. En efecto, mientras que la acumulación intracelular de DAT fue visible tanto con el tratamiento con monensina (bloqueo del reciclaje y de la degradación lisosomal) y con leupeptina (bloqueo de la degradación lisosomal únicamente), en el caso de GLT1 solo se observó con la monensina. Esto indica, por lo tanto, que el proceso de endocitosis constitutiva conduce a la mayor parte del transportador de dopamina hacia su degradación en los lisosomas mientras que el destino del transportador GLT1 internalizado en condiciones basales es su reciclaje a membrana plasmática desde los endosomas tempranos. En efecto, este proceso de reciclaje fue visible gracias a la construcción NGFR-GLT1, la cual tras ser internalizada en condiciones basales, regresó a membrana plasmática prolongando el tiempo de incubación a 37°C. El reciclaje de GLT1 a membrana plasmática parece tomar la vía rápida asociada a Rab4 y no la vía de reciclaje tardío asociada a la GTPasa Rab11 (*"long loop" recycling*). Teniendo en cuenta la gran cantidad de proteínas que pueden intervenir en el reciclaje a membrana plasmática (Hsu y Prekeris, 2010), estudios más en profundidad utilizando dominantes negativos de estas RabGTPasas así como para determinar exactamente las proteínas implicadas en el retorno del transportador a membrana plasmática resultaran necesarios para caracterizar íntegramente el proceso de reciclaje de GLT1 puesto de manifiesto en este estudio.

El reciclaje a superficie celular de las proteínas de membrana en cuyo tráfico interviene el marcaje por ubiquitinación puede estar regulado por el proceso de desubiquitinación en compartimentos endosomales tempranos. Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de desubiquitinación se lleva a cabo gracias a la acción de isopeptidasas denominadas desubiquitininasas o enzimas desubiquitinantes. Existen más de 80 desubiquitininasas codificadas en el genoma humano, por lo que existe en este proceso también, un alto nivel de especificidad (Nijman et al., 2005). Este es el caso del receptor EGFR cuyo reciclaje está regulado por la desubiquitinasa endosomal AMSH (McCullough et al., 2004; Huang et al., 2006; Clague y Urbe, 2006) o del canal epitelial de sodio (ENaC) y su regulación por parte de las enzimas desubiquitinantes USP2-45 y UCH L3 (Ruffieux-Daidié et al., 2008; Butterworth et al., 2007).

En este estudio, se presenta la primera evidencia directa de un neurotransportador cuyo reciclaje de vuelta a membrana plasmática está regulado por la actividad de una desubiquitinasa. En efecto, hemos demostrado que el retorno a membrana del transportador GLT1 internalizado constitutivamente requiere de la actividad de la enzima desubiquitinante UCH L1, ya que su inhibición específica en células MDCK y C6 produce la acumulación intracelular de transportador ubiquitinado. Si la inhibición de esta enzima desubiquitinante se prolonga, y por lo tanto el transportador GLT1 permanece ubiquitinado, entonces pasa a degradación lisosomal. Esta desubiquitinasa es muy abundante en el sistema nervioso, representando entre el 1-2% del total de proteína soluble en el cerebro (Wilkinson et al., 1989), interviene en numerosas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Leroy et al., 1998) o la de Alzheimer (Choi et al., 2004) y su actividad determina una correcta estructura y función sináptica (Cartier et al., 2009). Así, UCH L1 parece ser un importante regulador de la homeostasis de la ubiquitina en la sinapsis regulando los niveles de ubiquitina libre disponible para el marcaje de proteínas (Osaka et al., 2003). Por otra parte, esta desubiquitinasa interviene en la neurotransmisión glutamatergica no solo regulando los niveles de transportador GLT1 en membrana plasmática, sino también a través de su interacción con el receptor de glutamato tipo NMDA. En efecto, Cartier y colaboradores (2009) observaron como la activación del receptor NMDA produce un aumento en la actividad de UCH L1 que aumenta los niveles de ubiquitina monomérica libre en neuronas. Por otra parte, estos autores observaron que el papel de esta desubiquitinasa en mantener una correcta estructura sináptica, lo realiza afectando a

la estabilidad de ciertas proteínas de anclaje de la sinapsis. Entre ellas, la más importante resultó ser PSD-95, proteína que interactúa también con el transportador GLT1 (Gonzalez-Gonzalez et al., 2008; Cartier et al., 2009). Estos resultados concuerdan con la regulación del proceso de reciclaje a membrana plasmática de GLT1 demostrado en este estudio. Así, una activación del receptor NMDA produciría un aumento en la actividad de la desubiquitinasa UCH L1 que aceleraría el proceso de reciclaje del transportador GLT1 a membrana plasmática y consecuentemente garantizaría una mayor actividad de recaptación del neurotransmisor que evitaría efectos nocivos para las neuronas por excitotoxicidad. Estudios en astrocitos con esta y otras desubiquitinases de las que disponemos en la actualidad, revelarán en el futuro más datos de cómo el proceso de desubiquitinación interviene en la regulación del tráfico intracelular basal del transportador GLT1.

Una vez retirada la ubiquitina, el transportador GLT1 se dirige a membrana plasmática en vesículas de reciclaje. En este estudio, hemos observado como el retorno de estas vesículas está regulado por los niveles de calcio intracelular. En efecto, la retirada de este catión del citoplasma celular produjo una acumulación intracelular de GLT1 que dependía de la ubiquitinación de la región carboxilo terminal del transportador. En este caso sin embargo, la lisina más importante resultó ser la 526 únicamente. Estas diferencias pueden deberse a que el calcio intracelular este afectando directamente al proceso de ubiquitinación y que su retirada, por ejemplo, altere la actividad de la ubiquitin ligasa (E3) implicada en el tráfico intracelular basal del transportador, alterándose así el patrón de ubiquitinación de GLT1. Este catión ya ha sido descrito como un agente regulador de neurotransportadores de glutamato. Así, Murphy y colaboradores (2009) observaron como la entrada de calcio en células C6 aumentaba la actividad de transporte de EAAC1 (Murphy et al., 2009). La regulación de la fusión de las vesículas de reciclaje portadoras de GLT1 por parte del calcio intracelular sería equivalente a la que ejerce en neuronas regulando la fusión de las vesículas cargadas de neurotransmisor con la membrana presináptica (Rizo y Rosenmund, 2008). En astrocitos el calcio intracelular representa igualmente un importante regulador del proceso de exocitosis. En efecto, la liberación de mensajeros como el glutamato o el péptido atrial natriuretico por parte de las células de glía es un proceso dependiente de calcio en el que intervienen proteínas tipo SNARE como la sinaptobrevina, involucradas en la exocitosis vesicular (Kreft et al., 2004). Estudios más

en profundidad del efecto del calcio intracelular sobre el reciclaje de GLT1 en astrocitos, así como de las proteínas implicadas en el proceso resultan imprescindibles para comprender íntegramente el papel de este catión en el tráfico intracelular basal de GLT1. Asimismo, ensayos electrofisiológicos podrán aportar datos muy interesantes de cómo variaciones en los niveles de calcio afectan tanto a la actividad como a la expresión en membrana del transportador GLT1.

Finalmente, en este estudio, se ha demostrado la interacción en cerebro del transportador GLT1 situado en membrana plasmática con diversas proteínas mediante un análisis proteómico. Las proteínas halladas sugieren un papel importante para el transportador GLT1 en las sinapsis glutamatérgicas. En efecto, GLT1 interacciona con la proteína NCAM, la contactina 1 y con los neurofilamentos, proteínas de adhesión celular miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y componentes del citoesqueleto, respectivamente, esenciales para la formación, plasticidad y maduración de la sinapsis (Togashi et al., 2009; Shimoda y Watanabe, 2009).

Por otra parte, los resultados hallados demuestran una estrecha relación entre la vaina de mielina y el transportador de glutamato GLT1. En efecto, además de interaccionar directamente con la proteína proteolipídica de la mielina, la contactina1 ha sido identificada como un componente de dominios especializados de las fibras mielinizadas, como los nodos de Ranvier (Salzer, 2003) y como ligando de la proteína NOTCH1, interviene en el desarrollo de los oligodendrocitos (Hu et al., 2003; Cui et al., 2004), células que forman esta vaina de mielina.

Por último, hallamos evidencias de que el transportador GLT1 interacciona con la sodio-potasio ATPasa. Esta interacción ha sido ya descrita por otros autores y pone de manifiesto la importancia de esta proteína como moduladora de la recaptación de glutamato a través de la generación del gradiente de sodio, esencial para la actividad de GLT1 (Rose et al., 2009). En efecto, estos autores proponen una regulación del transportador GLT1 por parte de la sodio-potasio ATPasa a través de la tirosin kinasa Src con la que podrían estar formando un complejo multiprotéico, aunque no descartan la posibilidad de una interacción directa entre GLT1 y Na,K ATPasa.

Todas estas interacciones evidenciadas mediante este análisis proteómico demuestran el papel central que el transportador GLT1 desarrolla en el sistema nervioso

central y habrán de ser estudiadas más en profundidad para determinar el papel exacto de todas aquellas proteínas que interaccionan con GLT1 y de cómo cada una de ellas afecta y modula su actividad.

Así, en este estudio hemos demostrado la existencia de un tráfico intracelular basal del transportador GLT1, dependiente de la ubiquitinación de su región carboxilo terminal y de la vía de endocitosis mediada por clatrina. El reciclaje a membrana plasmática desde los endosomas tempranos, se lleva a cabo, tras la retirada de la ubiquitina, mediada por la desubiquitinasa UCHL1 y la fusión de las vesículas de reciclaje proceso regulado por los niveles de calcio intracelular. Todo este proceso puede observarse esquematizado en la Figura 40 a continuación:

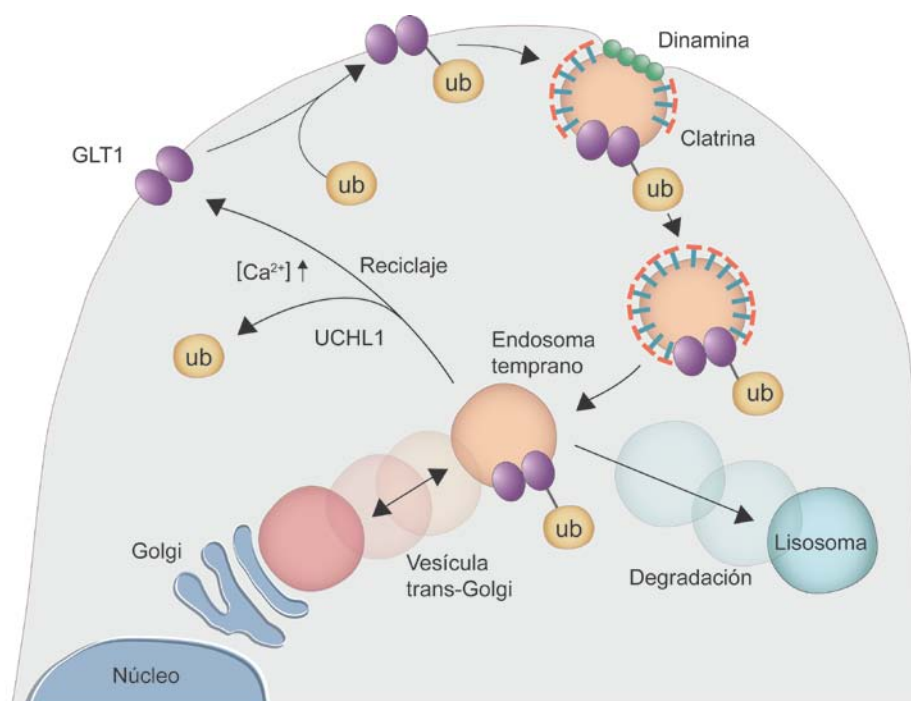


Figura 40. Esquema del tráfico intracelular basal del transportador GLT1.

El transportador GLT1 está sujeto a un proceso de endocitosis constitutiva, dependiente de la ubiquitinación de su región carboxilo terminal (Lys⁵¹⁷ y Lys⁵²⁶) y que es dependiente de clatrina. Una vez internalizado, GLT1 se acumula en los endosomas tempranos desde los cuales se recicla a membrana plasmática. Este proceso de reciclaje sigue la vía rápida (*“short loop” recycling*) y depende de la desubiquitinación del transportador en cuyo proceso interviene la enzima desubiquitinante UCHL1. La fusión de las vesículas de reciclaje portadoras de GLT1 con la membrana plasmática es un proceso regulado por los niveles de calcio intracelular. El transportador que permanece ubiquitinado pasa a ser degradado en los lisosomas.

VI. CONCLUSIONES

1. El transportador de glutamato GLT1 está sujeto a un proceso de endocitosis constitutiva desde membrana plasmática que toma la vía de endocitosis dependiente de clatrina.
2. El transportador GLT1 endocitado constitutivamente queda retenido en los endosomas tempranos involucrados en la vía rápida de reciclaje a membrana plasmática.
3. La internalización constitutiva de GLT1 es dependiente de la ubiquitinación de la región carboxilo terminal del transportador, siendo los residuos de mayor importancia en este proceso las lisinas 517 y 526.
4. El transportador GLT1 se recicla desde los endosomas tempranos a la membrana plasmática. Este reciclaje es dependiente de la desubiquitinación del transportador, proceso llevado a cabo por la desubiquitinasa UCH L1.
5. La fusión de las vesículas de reciclaje portadoras del transportador GLT1 es un proceso regulado por los niveles de calcio intracelular.
6. El transportador GLT1 interacciona en sistema nervioso con componentes de la vaina de mielina así como moléculas de adhesión celular y con la sodio-potasio ATPasa.

VII. RESUMEN

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in mammalian central nervous system. After it is released to the synaptic cleft, glutamate has to be uptaken for limiting excitotoxicity. Dysregulation of this process has been implicated in a wide array of neurological disorders. The majority of forebrain glutamate uptake is mediated by the astroglial glutamate transporter, GLT1. Trafficking of GLT1 to and from the cell surface is critical for its function. Activation of PKC down-regulates the activity of GLT1 by producing endocytosis and degradation of the transporter in the lysosomes. This regulation is mediated by the ubiquitination of lysine residues in the carboxyl terminus of GLT1.

In this study, we have demonstrated that the glutamate transporter GLT1 undergoes constitutive endocytosis and that this internalization is mediated by clathrin dependent pathway. This constitutive internalization of GLT1 is also regulated by the ubiquitination of the lysine residues in the carboxyl terminus. Intracellular accumulation of GLT1 is sorted to early endosomes Rab4 positive “short loop” recycling pathway. We also found the first evidence of a neurotransmitter whose recycling to plasma membrane is regulated by deubiquitination. Indeed, trafficking of GLT1 back to plasma membrane from early endosomes is regulated by the deubiquitinase UCH L1. The recycling vesicles carrying GLT1 fuse with the plasma membrane in an intracellular calcium dependent manner. Finally, we found evidences of interactions between the transporter GLT1 and components of the myelin sheath, adhesion molecules and the Na,K-ATPase in brain

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hakim, A. K., A. Zagorska, et al. (2008). "Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains." Biochem J **411**(2): 249-60.
- Allen, J. A., R. A. Halverson-Tamboli, et al. (2007). "Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling." Nat Rev Neurosci **8**(2): 128-40.
- Apparsundaram, S., S. Schroeter, et al. (1998). "Acute regulation of norepinephrine transport: II. PKC-modulated surface expression of human norepinephrine transporter proteins." J Pharmacol Exp Ther **287**(2): 744-51.
- Arriza, J. L., S. Eliasof, et al. (1997). "Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4155-60.
- Berger, U. V. and M. A. Hediger (2000). "Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia." J Comp Neurol **421**(3): 385-99.
- Bickford, L. C., E. Mossessova, et al. (2004). "A structural view of the COPII vesicle coat." Curr Opin Struct Biol **14**(2): 147-53.
- Boukroun, S., D. Ruffieux-Daidie, et al. (2008). "Vasopressin-inducible ubiquitin-specific protease 10 increases ENaC cell surface expression by deubiquitylating and stabilizing sorting nexin 3." Am J Physiol Renal Physiol **295**(4): F889-900.
- Broer, S. and N. Brookes (2001). "Transfer of glutamine between astrocytes and neurons." J Neurochem **77**(3): 705-19.

- Bruhn, T., L. M. Levy, et al. (2000). "Ischemia induced changes in expression of the astrocyte glutamate transporter GLT1 in hippocampus of the rat." Neurochem Int **37**(2-3): 277-85.
- Budnik, A. and D. J. Stephens (2009). "ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation." FEBS Lett **583**(23): 3796-803.
- Butchbach, M. E., G. Tian, et al. (2004). "Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function." J Biol Chem **279**(33): 34388-96.
- Butterworth, M. B., R. S. Edinger, et al. (2007). "The deubiquitinating enzyme UCH-L3 regulates the apical membrane recycling of the epithelial sodium channel." J Biol Chem **282**(52): 37885-93.
- Cao, Z., X. Wu, et al. (2007). "Neuregulin-induced ErbB3 downregulation is mediated by a protein stability cascade involving the E3 ubiquitin ligase Nrdp1." Mol Cell Biol **27**(6): 2180-8.
- Cartier, A. E., S. N. Djakovic, et al. (2009). "Regulation of synaptic structure by ubiquitin C-terminal hydrolase L1." J Neurosci **29**(24): 7857-68.
- Casado, M., A. Bendahan, et al. (1993). "Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C." J Biol Chem **268**(36): 27313-7.
- Clague, M. J. and S. Urbe (2006). "Endocytosis: the DUB version." Trends Cell Biol **16**(11): 551-9.
- Conti, F., S. DeBiasi, et al. (1998). "EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex." Cereb Cortex **8**(2): 108-16.
- Corey, J. L., N. Davidson, et al. (1994). "Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter." J Biol Chem **269**(20): 14759-67.
- Crosson, C. E. and M. Petrovich (1999). "Contributions of adenosine receptor activation to the ocular actions of epinephrine." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(9): 2054-61.
- Cubelos, B., I. M. Gonzalez-Gonzalez, et al. (2005). "The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization." J Neurochem **95**(4): 1047-58.
- Cui, X. Y., Q. D. Hu, et al. (2004). "NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes." J Biol Chem **279**(24): 25858-65.

- Chaudhry, F. A., K. P. Lehre, et al. (1995). "Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry." Neuron **15**(3): 711-20.
- Chaudhry, F. A., R. J. Reimer, et al. (1999). "Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission." Cell **99**(7): 769-80.
- Chen, W., C. Aoki, et al. (2002). "Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain." J Neurosci **22**(6): 2142-52.
- Chen, W., V. Mahadomrongkul, et al. (2004). "The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons." J Neurosci **24**(5): 1136-48.
- Choi, J., A. I. Levey, et al. (2004). "Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases." J Biol Chem **279**(13): 13256-64.
- D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier (2006). "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 347-58.
- Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol **65**(1): 1-105.
- Dancourt, J. and C. Barlowe (2010) "Protein sorting receptors in the early secretory pathway." Annu Rev Biochem **79**: 777-802.
- Daniels, G. M. and S. G. Amara (1999). "Regulated trafficking of the human dopamine transporter. Clathrin-mediated internalization and lysosomal degradation in response to phorbol esters." J Biol Chem **274**(50): 35794-801.
- Davis, K. E., D. J. Straff, et al. (1998). "Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma." J Neurosci **18**(7): 2475-85.
- Derouiche, A. and T. Rauen (1995). "Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance." J Neurosci Res **42**(1): 131-43.
- DeWire, S. M., S. Ahn, et al. (2007). "Beta-arrestins and cell signaling." Annu Rev Physiol **69**: 483-510.
- Domercq, M. and C. Matute (1999). "Expression of glutamate transporters in the adult bovine corpus callosum." Brain Res Mol Brain Res **67**(2): 296-302.

- Drag, M., J. Mikolajczyk, et al. (2008). "Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of DUBs (deubiquitinating enzymes)." Biochem J **415**(3): 367-75.
- Dunlop, J., Z. Lou, et al. (1999). "Steroid hormone-inducible expression of the GLT-1 subtype of high-affinity l-glutamate transporter in human embryonic kidney cells." Biochem Biophys Res Commun **265**(1): 101-5.
- Dunlop, J., Z. Lou, et al. (1999). "Inducible expression and pharmacology of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of L-glutamate transporter." Br J Pharmacol **128**(7): 1485-90.
- Ehrlich, M., W. Boll, et al. (2004). "Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits." Cell **118**(5): 591-605.
- Eriksen, J., W. E. Bjorn-Yoshimoto, et al. (2010). "Postendocytic sorting of constitutively internalized dopamine transporter in cell lines and dopaminergic neurons." J Biol Chem **285**(35): 27289-301.
- Eriksen, J., S. G. Rasmussen, et al. (2009). "Visualization of dopamine transporter trafficking in live neurons by use of fluorescent cocaine analogs." J Neurosci **29**(21): 6794-808.
- Fairman, W. A., R. J. Vandenberg, et al. (1995). "An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel." Nature **375**(6532): 599-603.
- Fernandez-Sanchez, E., J. Martinez-Villarreal, et al. (2009). "Constitutive and regulated endocytosis of the glycine transporter GLYT1b is controlled by ubiquitination." J Biol Chem **284**(29): 19482-92.
- Furness, D. N. and K. P. Lehre (1997). "Immunocytochemical localization of a high-affinity glutamate-aspartate transporter, GLAST, in the rat and guinea-pig cochlea." Eur J Neurosci **9**(9): 1961-9.
- Gomeza, J., F. Zafra, et al. (1995). "Regulation by phorbol esters of the glycine transporter (GLYT1) in glioblastoma cells." Biochim Biophys Acta **1233**(1): 41-6.
- Gonzalez-Gonzalez, I. M., N. Garcia-Tardon, et al. (2008). "The glutamate transporter GLT1b interacts with the scaffold protein PSD-95." J Neurochem **105**(5): 1834-48.
- Gonzalez-Gonzalez, I. M., N. Garcia-Tardon, et al. (2008). "PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster." Glia **56**(9): 963-74.
- González, M.I., Susarla, B.T.S. et al. (2004) 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, October 23-27, 2004, Abstr. 168.18, Society for Neuroscience, Washington, D.C.

- Gonzalez, M. I., E. Krizman-Genda, et al. (2007). "Caveolin-1 regulates the delivery and endocytosis of the glutamate transporter, excitatory amino acid carrier 1." J Biol Chem **282**(41): 29855-65.
- Gonzalez, M. I., B. T. Susarla, et al. (2007). "Constitutive endocytosis and recycling of the neuronal glutamate transporter, excitatory amino acid carrier 1." J Neurochem **103**(5): 1917-31.
- Gonzalez, M. I., B. T. Susarla, et al. (2005). "Evidence that protein kinase Calpha interacts with and regulates the glial glutamate transporter GLT-1." J Neurochem **94**(5): 1180-8.
- Guha, A., V. Sriram, et al. (2003). "Shibire mutations reveal distinct dynamin-independent and -dependent endocytic pathways in primary cultures of Drosophila hemocytes." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3373-86.
- Guillet, B. A., L. J. Velly, et al. (2005). "Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures." Neurochem Int **46**(4): 337-46.
- Haugsten, E. M., J. Malecki, et al. (2008). "Ubiquitination of fibroblast growth factor receptor 1 is required for its intracellular sorting but not for its endocytosis." Mol Biol Cell **19**(8): 3390-403.
- He, B. and W. Guo (2009). "The exocyst complex in polarized exocytosis." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 537-42.
- Hicke, L. and H. Riezman (1996). "Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis." Cell **84**(2): 277-87.
- Hoeller, D. and I. Dikic (2009). "Targeting the ubiquitin system in cancer therapy." Nature **458**(7237): 438-44.
- Holmseth, S., H. A. Scott, et al. (2009). "The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation." Neuroscience **162**(4): 1055-71.
- Hollmann, M., J. Boulter, et al. (1994). "Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc." Ren Physiol Biochem **17**(3-4): 182-3.
- Hong, S., R. B. Troyanovsky, et al. (2010) "Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(8): 3528-33.
- Hsu, V. W. and R. Prekeris (2010) "Transport at the recycling endosome." Curr Opin Cell Biol **22**(4): 528-34.

- Hu, M., P. Li, et al. (2005). "Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14." Embo J **24**(21): 3747-56.
- Hu, Q. D., B. T. Ang, et al. (2003). "F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation." Cell **115**(2): 163-75.
- Huang, F., L. K. Goh, et al. (2007). "EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 16904-9.
- Huang, F., D. Kirkpatrick, et al. (2006). "Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain." Mol Cell **21**(6): 737-48.
- Ingram, E. M., J. W. Wiseman, et al. (2001). "Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of the EL mouse." J Neurochem **79**(3): 564-75.
- Javitt, D. C. (2004). "Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders." Mol Psychiatry **9**(11): 984-97, 979.
- Jayanthi, L. D., D. J. Samuvel, et al. (2004). "Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization." J Biol Chem **279**(18): 19315-26.
- Kalandadze, A., Y. Wu, et al. (2002). "Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486." J Biol Chem **277**(48): 45741-50.
- Kanai, Y. and M. A. Hediger (1992). "Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter." Nature **360**(6403): 467-71.
- Kim, E. and M. Sheng (2004). "PDZ domain proteins of synapses." Nat Rev Neurosci **5**(10): 771-81.
- Kolling, R. and C. P. Hollenberg (1994). "The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants." Embo J **13**(14): 3261-71.
- Komander, D., C. J. Lord, et al. (2008). "The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module." Mol Cell **29**(4): 451-64.
- Komander, D., F. Reyes-Turcu, et al. (2009). "Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains." EMBO Rep **10**(5): 466-73.

- Kreft, M., M. Potokar, et al. (2009). "Regulated exocytosis and vesicle trafficking in astrocytes." Ann N Y Acad Sci **1152**: 30-42.
- Kreft, M., M. Stenovec, et al. (2004). "Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes." Glia **46**(4): 437-45.
- Kugler, P. and A. Schmitt (1999). "Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system." Glia **27**(2): 129-42.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, et al. (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway." Mol Cell **7**(3): 661-71.
- Lee, M. C., E. A. Miller, et al. (2004). "Bi-directional protein transport between the ER and Golgi." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 87-123.
- Lehre, K. P. and N. C. Danbolt (1998). "The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain." J Neurosci **18**(21): 8751-7.
- Lehre, K. P., L. M. Levy, et al. (1995). "Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations." J Neurosci **15**(3 Pt 1): 1835-53.
- Leroy, E., R. Boyer, et al. (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." Nature **395**(6701): 451-2.
- Li, S., M. Mallory, et al. (1997). "Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression." J Neuropathol Exp Neurol **56**(8): 901-11.
- Li, W., S. K. Chanda, et al. (2005). "Methods for the functional genomic analysis of ubiquitin ligases." Methods Enzymol **398**: 280-91.
- Lin, S. C., J. Y. Chung, et al. (2008). "Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20." J Mol Biol **376**(2): 526-40.
- Low, C. M. and K. S. Wee (2010). "New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function." Mol Pharmacol **78**(1): 1-11.
- Lu, Y., O. A. Adegoke, et al. (2009). "USP19 deubiquitinating enzyme supports cell proliferation by stabilizing KPC1, a ubiquitin ligase for p27Kip1." Mol Cell Biol **29**(2): 547-58.
- Ma, Q. (2007). "Aryl hydrocarbon receptor degradation-promoting factor (ADPF) and the control of the xenobiotic response." Mol Interv **7**(3): 133-7.

- Magnani, F., C. G. Tate, et al. (2004). "Partitioning of the serotonin transporter into lipid microdomains modulates transport of serotonin." J Biol Chem **279**(37): 38770-8.
- Massie, A., L. Cnops, et al. (2008). "High-affinity Na⁺/K⁺-dependent glutamate transporter EAAT4 is expressed throughout the rat fore- and midbrain." J Comp Neurol **511**(2): 155-72.
- Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 603-12.
- McCullough, J., M. J. Clague, et al. (2004). "AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase." J Cell Biol **166**(4): 487-92.
- McLauchlan, H., J. Newell, et al. (1998). "A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits." Curr Biol **8**(1): 34-45.
- Meierhofer, D., X. Wang, et al. (2008). "Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry." J Proteome Res **7**(10): 4566-76.
- Melikian, H. E. and K. M. Buckley (1999). "Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamine transporter." J Neurosci **19**(18): 7699-710.
- Miranda, M., K. R. Dionne, et al. (2007). "Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter." Mol Biol Cell **18**(1): 313-23.
- Miyamoto, E. (2006). "Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus." J Pharmacol Sci **100**(5): 433-42.
- Mizuno, E., K. Kobayashi, et al. (2006). "A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes." Traffic **7**(8): 1017-31.
- Murphy, A., A. Vines, et al. (2009). "Stimulation of EAAC1 in C6 glioma cells by store-operated calcium influx." Biochim Biophys Acta **1788**(2): 551-8.
- Murphy, J. E., B. E. Padilla, et al. (2009). "Endosomes: a legitimate platform for the signaling train." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17615-22.
- Nijman, S. M., M. P. Luna-Vargas, et al. (2005). "A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes." Cell **123**(5): 773-86.
- Osaka, H., Y. L. Wang, et al. (2003). "Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron." Hum Mol Genet **12**(16): 1945-58.
- Patel, A. B., R. A. De Graaf, et al. (2003). "Coupling of glutamatergic neurotransmission and neuronal glucose oxidation over the entire range of cerebral cortex activity." Ann N Y Acad Sci **1003**: 452-3.

- Peng, J., D. Schwartz, et al. (2003). "A proteomics approach to understanding protein ubiquitination." Nat Biotechnol **21**(8): 921-6.
- Pickart, C. M. and D. Fushman (2004). "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals." Curr Opin Chem Biol **8**(6): 610-6.
- Pines, G., N. C. Danbolt, et al. (1992). "Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter." Nature **360**(6403): 464-7.
- Praefcke, G. J. and H. T. McMahon (2004). "The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 133-47.
- Qian, Y., A. Galli, et al. (1997). "Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression." J Neurosci **17**(1): 45-57.
- Quick, M. W., J. L. Corey, et al. (1997). "Second messengers, trafficking-related proteins, and amino acid residues that contribute to the functional regulation of the rat brain GABA transporter GAT1." J Neurosci **17**(9): 2967-79.
- Rambhadran, A., J. Gonzalez, et al. (2010) "Subunit arrangement in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors." J Biol Chem **285**(20): 15296-301.
- Rao, V. L., M. K. Baskaya, et al. (1998). "Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain." J Neurochem **70**(5): 2020-7.
- Rauen, T., F. Fischer, et al. (1999). "Glia-neuron interaction by high-affinity glutamate transporters in neurotransmission." Adv Exp Med Biol **468**: 81-95.
- Rauen, T., M. Wiessner, et al. (2004). "A new GLT1 splice variant: cloning and immunolocalization of GLT1c in the mammalian retina and brain." Neurochem Int **45**(7): 1095-106.
- Rizo, J. and C. Rosenmund (2008). "Synaptic vesicle fusion." Nat Struct Mol Biol **15**(7): 665-74.
- Rose, E. M., J. C. Koo, et al. (2009). "Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase." J Neurosci **29**(25): 8143-55.
- Rossi, D. J., J. D. Brady, et al. (2007). "Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia." Nat Neurosci **10**(11): 1377-86.
- Rothstein, J. D., L. Martin, et al. (1994). "Localization of neuronal and glial glutamate transporters." Neuron **13**(3): 713-25.

- Rothstein, J. D., M. Van Kammen, et al. (1995). "Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **38**(1): 73-84.
- Row, P. E., I. A. Prior, et al. (2006). "The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation." J Biol Chem **281**(18): 12618-24.
- Ruffieux-Daidie, D., O. Poirot, et al. (2008). "Deubiquitylation regulates activation and proteolytic cleavage of ENaC." J Am Soc Nephrol **19**(11): 2170-80.
- Russell, C. and S. M. Stagg (2010). "New insights into the structural mechanisms of the COPII coat." Traffic **11**(3): 303-10.
- Salzer, J. L. (2003). "Polarized domains of myelinated axons." Neuron **40**(2): 297-318.
- Samuelsson, C., E. Kumlien, et al. (2000). "Decreased cortical levels of astrocytic glutamate transport protein GLT-1 in a rat model of posttraumatic epilepsy." Neurosci Lett **289**(3): 185-8.
- Sato, K., R. Adams, et al. (1995). "Modulation of a recombinant glycine transporter (GLYT1b) by activation of protein kinase C." J Neurochem **65**(5): 1967-73.
- Sato, Y., A. Yoshikawa, et al. (2008). "Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains." Nature **455**(7211): 358-62.
- Schmitt, A., E. Asan, et al. (2002). "A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system." Neuroscience **109**(1): 45-61.
- Schmitt, A., E. Asan, et al. (1997). "Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry." J Neurosci **17**(1): 1-10.
- Schwartz, S. L., C. Cao, et al. (2007). "Rab GTPases at a glance." J Cell Sci **120**(Pt 22): 3905-10.
- Sheldon, A. L., M. I. Gonzalez, et al. (2008). "Ubiquitination-mediated internalization and degradation of the astroglial glutamate transporter, GLT-1." Neurochem Int **53**(6-8): 296-308.
- Shevchenko, A., M. Wilm, et al. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." Anal Chem **68**(5): 850-8.
- Shimoda, Y. and K. Watanabe (2009). "Contactins: emerging key roles in the development and function of the nervous system." Cell Adh Migr **3**(1): 64-70.
- Sigismund, S., E. Argenzio, et al. (2008). "Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation." Dev Cell **15**(2): 209-19.

- Sigismund, S., T. Woelk, et al. (2005). "Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2760-5.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Simonsen, A., R. Lippe, et al. (1998). "EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion." Nature **394**(6692): 494-8.
- Sorkina, T., B. R. Hoover, et al. (2005). "Constitutive and protein kinase C-induced internalization of the dopamine transporter is mediated by a clathrin-dependent mechanism." Traffic **6**(2): 157-70.
- Sorkina, T., M. Miranda, et al. (2006). "RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis." J Neurosci **26**(31): 8195-205.
- Stenmark, H. (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 513-25.
- Storck, T., S. Schulte, et al. (1992). "Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10955-9.
- Sullivan, R., T. Rauen, et al. (2004). "Cloning, transport properties, and differential localization of two splice variants of GLT-1 in the rat CNS: implications for CNS glutamate homeostasis." Glia **45**(2): 155-69.
- Susarla, B. T. and M. B. Robinson (2008). "Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester." Neurochem Int **52**(4-5): 709-22.
- Takumi, Y., A. Matsubara, et al. (1997). "Discrete cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and the glutamate transporter GLAST in the rat vestibular end organ." Neuroscience **79**(4): 1137-44.
- Tan, J., O. Zeleniaia, et al. (1999). "Expression of the GLT-1 subtype of Na⁺-dependent glutamate transporter: pharmacological characterization and lack of regulation by protein kinase C." J Pharmacol Exp Ther **289**(3): 1600-10.
- Tanaka, K. (1993). "Expression cloning of a rat glutamate transporter." Neurosci Res **16**(2): 149-53.
- Tian, G., L. Lai, et al. (2007). "Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression." J Biol Chem **282**(3): 1727-37.
- Togashi, H., T. Sakisaka, et al. (2009). "Cell adhesion molecules in the central nervous system." Cell Adh Migr **3**(1): 29-35.

- Traub, L. M. (2009). "Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(9): 583-96.
- Traub, L. M. and G. L. Lukacs (2007). "Decoding ubiquitin sorting signals for clathrin-dependent endocytosis by CLASPs." J Cell Sci **120**(Pt 4): 543-53.
- Trotti, D., A. Rolfs, et al. (1999). "SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter." Nat Neurosci **2**(5): 427-33.
- Tzingounis, A. V. and J. I. Wadiche (2007). "Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission." Nat Rev Neurosci **8**(12): 935-47.
- Ungewickell, E. J. and L. Hinrichsen (2007). "Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding." Curr Opin Cell Biol **19**(4): 417-25.
- Vembar, S. S. and J. L. Brodsky (2008). "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(12): 944-57.
- Wilkinson, K. D., K. M. Lee, et al. (1989). "The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase." Science **246**(4930): 670-3.
- Yamada, K., M. Watanabe, et al. (1996). "EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses." Neuroreport **7**(12): 2013-7.
- Yang, Y., O. Gozen, et al. (2009). "Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1." Neuron **61**(6): 880-94.
- Yang, Y., J. Kitagaki, et al. (2007). "Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics." Cancer Res **67**(19): 9472-81.
- Yernool, D., O. Boudker, et al. (2004). "Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*." Nature **431**(7010): 811-8.
- Young, A. (2007). "Structural insights into the clathrin coat." Semin Cell Dev Biol **18**(4): 448-58.
- Zelenaia, O. A. and M. B. Robinson (2000). "Degradation of glial glutamate transporter mRNAs is selectively blocked by inhibition of cellular transcription." J Neurochem **75**(6): 2252-8.
- Zhou, J. and M. L. Sutherland (2004). "Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity." J Neurosci **24**(28): 6301-6.

